

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000278

International filing date: 31 January 2005 (31.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2005-0006595  
Filing date: 25 January 2005 (25.01.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 05 April 2005 (05.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



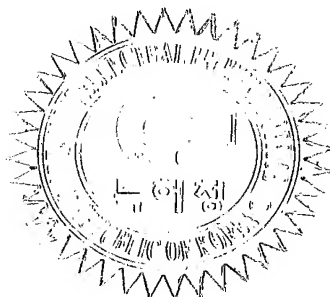
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2005-0006595  
Application Number

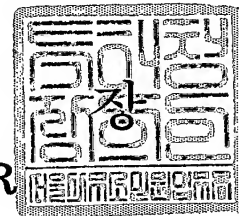
출원년월일 : 2005년 01월 25일  
Date of Application JAN 25, 2005

출원인 : (주)라이프코드  
Applicant(s) LIFECORD INC.



2005 년 02 월 17 일

특 허 청  
COMMISSIONER



## 【서지사항】

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2005.01.25  
**【발명의 명칭】** 제대혈로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하는 방법 및 이의 분화 유도방법  
**【발명의 영문명칭】** METHOD FOR ISOLATING AND CULTURING MULTIPOTENT PROGENITOR/STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION THEREOF  
**【출원인】**  
**【명칭】** (주)라이프코드  
**【출원인코드】** 1-2001-011424-5  
**【대리인】**  
**【성명】** 이현실  
**【대리인코드】** 9-1999-000366-5  
**【포괄위임등록번호】** 2001-016823-5  
**【대리인】**  
**【성명】** 장성구  
**【대리인코드】** 9-1998-000514-8  
**【포괄위임등록번호】** 2001-016819-1  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 이명우  
**【성명의 영문표기】** LEE, Myoung Woo  
**【주민등록번호】** 770201-1168346  
**【우편번호】** 420-011  
**【주소】** 경기도 부천시 원미구 심곡1동 75-4 2층

**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 김영진  
**【성명의 영문표기】** KIM,Young Jin  
**【주민등록번호】** 591024-1000218  
**【우편번호】** 137-948  
**【주소】** 서울특별시 서초구 잠원동 동아아파트 102동 2004호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 최정은  
**【성명의 영문표기】** CHOI, Jeong Eun  
**【주민등록번호】** 620820-2051711  
**【우편번호】** 463-958  
**【주소】** 경기도 성남시 분당구 정자동 28-1 로얄팰리스 B-2403  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 양말숙  
**【성명의 영문표기】** YANG,Mai Sook  
**【주민등록번호】** 730314-2675011  
**【우편번호】** 440-722  
**【주소】** 경기도 수원시 장안구 정자동 886-1 두견마을 벽산아파트  
336동 1804 호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 문영준  
**【성명의 영문표기】** MOON,Young Joon  
**【주민등록번호】** 760601-1058111  
**【우편번호】** 152-059

- 【주소】** 서울특별시 구로구 구로본동 480-23  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 김선경  
**【성명의 영문표기】** KIM, Sun Kyung  
**【주민등록번호】** 750825-2079511  
**【우편번호】** 445-986  
**【주소】** 경기도·화성시 태안읍 병점리 두산아파트 107동 1202호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 김효철  
**【성명의 영문표기】** KIM, Hugh Chul  
**【주소】** 경기도 수원시 팔달구 인계동 1122-10 삼호타워 1504  
**【국적】** US  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 박준성  
**【성명의 영문표기】** PARK, Joon Seong  
**【주민등록번호】** 651017-1025611  
**【우편번호】** 442-757  
**【주소】** 경기도 수원시 팔달구 원천동 원천주공아파트 104동 805호  
**【국적】** KR  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 장인근  
**【성명의 영문표기】** JANG, In Keun  
**【주민등록번호】** 760427-1817212  
**【우편번호】** 442-192  
**【주소】** 경기도 수원시 팔달구 우만2동 우만주공아파트 108동 405호  
**【국적】** KR

**【우선권 주장】**

**【출원국명】** KR  
**【출원종류】** 특허  
**【출원번호】** 10-2004-0006088  
**【출원일자】** 2004.01.30  
**【증명서류】** 첨부

**【심사청구】** 청구

**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**

**【서열개수】** 28  
**【서열목록의 전자문서】** 첨부

**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 이현실 (인) 대리인  
 장성구 (인)

**【수수료】**

**【기본출원료】** 0 면 38,000 원  
**【가산출원료】** 73 면 0 원  
**【우선권주장료】** 1 건 20,000 원  
**【심사청구료】** 34 항 1,197,000 원  
**【합계】** 1,255,000 원  
**【감면사유】** 중소기업  
**【감면후 수수료】** 637,500 원

**【첨부서류】** 1.기타첨부서류[우선권증명서류{2004년 1월 30일자로 특허청에 기재 출원 것을 원용함}]\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포(multipotent progenitor/stem cell)를 분리하여 배양하는 방법 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 다양한 조직의 세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 제대혈 유래 단핵세포를 통상적인 동물세포 배양용 배지에 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), L-글루타민 및 과립구-대식세포 콜로니 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)가 첨가된 1차 배양배지; 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 배양배지; 및 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF 대신에 줄기세포인자(stem cell factor, SCF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 첨가된 3차 배양배지에 순차적으로 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하는 방법, 및 상기 방법에 의해 배양된 전구/줄기세포를 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 내피세포, 간세포 및 수지상세포 등과 같은 다양한 조직의 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 제대혈 유래 단핵세포로부터 얻어진 다분화능 전구/줄기세포는 대량생산이 가능하고 다양한 조직세포로의 분화가 효율적으로 유도되므로, 세포요법(cell therapy), 세포대체요법(cell replacement therapy), 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1



### 【발명의 명칭】

제대혈로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하는 방법 및 이의 분  
화 유도방법{METHOD FOR ISOLATING AND CULTURING MULTIPOTENT PROGENITOR/STEM  
CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION  
THEREOF}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과이고,
- <2> A:  $\times 100$ , B:  $\times 200$
- <3> 도 2는 본 발명에 따라 배양된 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 면역표현형 발현양상을 분석한 결과이고,
- <4> 도 3a 및 3b는 본 발명에 따라 배양된 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 배양시간에 따른 면역표현형의 변화를 조사한 결과이고,
- <5> 도 4는 본 발명에 따라 배양된 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 배양시간에 따른 증식율을 조사한 결과이고,
- <6> 도 5는 본 발명에 따라 배양된 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 세포주기를 조사한 결과이고,

<7> 도 6은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 신경세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과이고,

<8> A: 분화유도 0일째, B: 분화유도 3일째

<9> C: 분화유도 7일째, D: 분화유도 14일째

<10> 도 7은 본 발명에 따른 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 신경세포로의 분화를 형광-(D 내지 I) 또는 면역세포화학염색법(A 내지 C)으로 관찰한 결과이고,

<11> A: MAP-1B 염색, B: NF-L 염색

<12> C: NSE 염색, D: 핵 염색

<13> E: 핵 염색, F: 핵 염색

<14> G: MAP-1B 염색, H: NF-L 염색

<15> I: NSE 염색, J: D와 G를 겹친 그림

<16> K: E와 H를 겹친 그림, L: F와 I를 겹친 그림

<17> M: IMR32(neuroblastoma cell line)를 이용한 MAP-1B 염색(양성대조군)

<18> N: IMR32를 이용한 NF-L 염색(양성대조군)

<19> O: IMR32를 이용한 NSE 염색(양성대조군)

<20> 도 8은 본 발명에 따른 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 신경세포로의 분화를 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과이고,

<21> C(0): 분화유도 0일째, 3: 분화유도 3일째

<22> 7: 분화유도 7일째, 14: 분화유도 14일째

<23> P: IMR32(양성대조군)

<24> 도 9는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 신경세포의 종류를 면역조직화학염색법 및 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과이고,

<25> A: 미분화(음성대조군), B: TH 염색(도파민성 신경세포)

<26> C: AchE 염색(콜린성 신경세포), D: GAD 염색(가바성 신경세포)

<27> E: 웨스턴 블롯팅, C(0); 분화유도 전

<28> I: 14일 동안 분화유도

<29> 도 10은 본 발명에 따른 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 신경교세포의 분화를 형광-(A 내지 F) 또는 면역조직화학염색법(G 및 H)으로 분석한 결과이고,

<30> A: 핵 염색, B: 핵 염색

<31> C: GFAP 염색, D: 마이엘린/올리고덴드로사이트 염색

<32> E: A와 C를 겹친 그림, F: B와 D를 겹친 그림

<33> G: GFAP 염색, H: 마이엘린/올리고덴드로사이트 염색

<34> 도 11은 본 발명에 따른 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화를 현미경 관찰 및 ALP 염색으로 분석한 결과이고,

<35> A: 분화된 골모세포의 형태, B: 분화된 골모세포의 ALP 염색

<36> 도 12는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 골모세포의 특이적 유전자의 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로

분석한 결과이고,

<37> M: 크기 표지자

<38> 1: 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 분화시킨 골모세포(양성대조군)

<39> 2: 분화유도 전, 3: 분화유도 후

<40> 도 13은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 근육모세포의 특이적 유전자의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과이고,

<41> M: 크기 표지자, 1: 분화유도 1주일째

<42> 2: 분화유도 2주일째, 3: 분화유도 3주일째

<43> 4: 분화유도 4주일째, 5: 분화유도 5주일째

<44> 도 14는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 근육모세포의 특이적 단백질의 발현을 형광 면역세포화학염색법으로 분석한 결과이고,

<45> A: 마이오제닌 염색, B: 핵 염색

<46> C: A와 B를 겹친 그림

<47> 도 15는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 내피세포의 특이적 면역표현형을 분석한 결과이고,

<48> 도 16은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 내피세포의 특이적 유전자의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과이고,

<49> M: 크기 표지자, 1: 분화유도 전

- <50>                    2: 분화유도 후 3일째,                    3: 분화유도 후 7일째
- <51>                    4: 분화유도 후 14일째,
- <52>                    5: HUVEC(인간 제대정맥 유래 내피세포, 양성대조군)
- <53>                    도 17은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유  
 도된 내피세포의 특이적 ecNOS 단백질의 발현을 분석한 결과이고,
- <54>                    7: 분화유도 7일째,                    14: 분화유도 14일째
- <55>                    HUVEC: 인간 제대정맥 유래 내피세포
- <56>                    도 18은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유  
 도된 내피세포의 특이적 단백질의 발현을 형광 면역세포화학염색법으로 분석한 결  
 과이고,
- <57>                    A: vWF 염색,                    B: 핵 염색
- <58>                    C: A와 B를 겹친 그림,                    D: UEA-1 염색
- <59>                    E: Ac-LDL 섭취,                    F: D와 E를 겹친 그림
- <60>                    도 19는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유  
 도된 내피세포의 튜브 형성을 조사한 결과이고,
- <61>                    A: 분화 전 다분화능 전구/줄기세포,                    B: 분화유도 후 튜브 형성
- <62>                    C: HUVEC를 이용한 튜브 형성(양성대조군)
- <63>                    도 20은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유  
 도된 내피세포의 혈관내피세포 성장인자(VEGF) 분비 여부를 조사한 결과이고,

<64> 도 21은 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 간세포의 특이적 유전자의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과이고,

<65> M: 크기 표지자, 1: HepG2(간암세포주)

<66> 2: 미분화된 다분화능 전구/줄기 세포

<67> 3: 다분화능 전구/줄기 세포로부터 분화유도된 간세포

<68> 4: 음성대조군

<69> 도 22는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 간세포의 특이적 단백질의 발현을 면역세포화학염색법으로 분석한 결과이고,

<70> A: 미분화된 다분화능 전구/줄기세포에서의 CK-8

<71> B: 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 간세포에서의 CK-8

<72> C: 미분화된 다분화능 전구/줄기세포에서의 알부민

<73> D: 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 간세포에서의 알부민

<74> 도 23은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 미성숙 수지상세포의 텍스트란-FITC 섭취능을 조사한 결과이고,

<75> 도 24는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 성숙 수지상세포의 면역표현형을 분석한 결과이고,

<76> 도 25는 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 성숙 수지상세포의 T 림프구 증식 유도효과를 조사한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<77>           본 발명은 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포(multipotent progenitor/stem cell)를 분리하여 배양하는 방법 및 이들을 다양한 조직의 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

<78>           줄기세포란 미분화 상태에서 무한 증식능력(self-renewal capacity)과 더불어 특정한 분화유도자극에 의해 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 능력(multi-differentiation potency)을 가지고 있는 세포를 말하며, 여러 인체 조직에서 찾아볼 수 있다.

<79>           줄기세포는 분화능(differentiation potency)과 생성시기에 따라 크게 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ES cell)와 성체줄기세포(adult stem cell)로 나눌 수 있다. 배아줄기세포는 수정란의 형성 후 자궁내막에 착상하기 전의 초기단계인 포배기(blastocyst) 배아 중 태아로 발생할 내세포괴(inner cell mass)로부터 분리할 수 있다. 상기 세포는 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 3가지 배엽을 포함하고, 인체 대부분의 특이적 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 그러나, 배아줄기세포를 얻는 데에는 윤리적인 문제가 따를 뿐만 아니라 이들 세포의 분화능을 조절하는 것 또한 현재까지 해결해야 할 과제로 남아 있다.

<80>            반면, 성체줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다. 이러한 성체줄기세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 담당한다.

<81>            대표적인 성체줄기세포에는 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)와 중간엽(간엽) 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)가 있다. 조혈모세포는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 주로 혈액내의 혈구세포로 분화하는 반면, 중간엽(간엽) 줄기세포는 골모세포(osteoblast), 연골모세포(chondroblast), 지방세포(adipocyte) 및 근육모세포(myoblast) 등의 중배엽성 조직의 세포로 분화하는 것으로 알려져 있다.

<82>            상기한 배아줄기세포 혹은 성체줄기세포의 분리 및 배양방법이 알려지면서 세포치료제로서의 임상적 적용에 관심이 고조되고 있다. 줄기세포를 이용하여 파킨슨씨병, 알츠하이머 병과 같은 신경퇴행성 질환이나 척추 손상에 의한 사지마비, 백혈병, 중풍, 소아 당뇨병, 심근경색, 간경화, 기타 만성질환 등과 같은 질환에 의해 파괴되어 부족한 세포를 외부로부터 공급해주는 세포대체요법(cell replacement therapy)이 부작용을 최소화하면서 최대의 치료효과를 기대할 수 있는 효과적인 치료법으로 제시되면서 현재 수많은 연구가 진행되고 있다.

<83>            성체줄기세포를 얻을 수 있는 대표적인 조직으로 골수가 알려져 있으며, 이러한 골수에는 조혈줄기세포, 중간엽(간엽) 줄기세포, 다분화능 성체전구세포



(multipotent adult progenitor cells; MAPCs) 등의 존재가 보고되어 있다. 특히, 골수 유래 다분화능 성체전구세포가 중간엽(간엽) 줄기세포와 같이 골모세포, 연골모세포, 지방세포 등으로 분화할 뿐만 아니라 신경세포, 내피세포, 간세포 등 다른 조직의 세포로도 분화가 가능하다는 연구가 발표되면서 많은 관심을 끌고 있다 (Reyes M, et al., *Blood* 98: 2615-2625, 2001; Reyes M, et al., *J. Clin. Invest.* 109: 337-346, 2002). 그러나, 골수에서 세포를 얻기 위해서는 여러 단계의 기술이 필요하고, 기술 과정이 복잡하여 채취 대상자에게 시간적, 정신적 및 육체적 고통을 수반하는 것이 보통이다. 또한, 골수 이식을 위해서는 조직적합항원 비교를 통해 항원 표현형이 일치하여 이식편대숙주반응을 보이지 않는 공여자를 찾아야 한다는 문제점이 있다.

&lt;84&gt;

골수에 존재하는 중간엽(간엽) 줄기세포는 1976년 프리에텐슈타인 등에 의해 처음 보고된 이후 그 분화능과 세포치료제로서의 가능성에 대해 수많은 연구가 이루어져 왔다(Friedenstein AJ, *Int. Rev. Cytol.* 47: 327-345, 1976). 특히, 연골 질환의 경우 현재 임상단계에의 응용이 거의 상용화된 상태이며, 골세포 치료제로서의 기능도 임상단계 진입을 눈앞에 두고 있다. 그러나, 골수에 존재하는 중간엽(간엽) 줄기세포는 제한적인 분화능과 증식능력으로 인해 그 응용범위가 한정적일 수밖에 없으며, 골수 유래라는 한계로 인해 세포를 얻기위한 기술과정이 복잡하고, 채취자에게 고통을 수반하는 등 기존에 골수 유래 세포를 얻는데 있어서의 문제점을 모두 내포하고 있다. 또한, 최근 알려진 골수 유래 다분화능 성체전구세포의 경우도 분화능의 측면에서 넓은 사용범위(신경세포, 간세포, 내피세포 등)를 가지

고는 있으나, 골수 유래라는 한계점과 더불어 그 분리 및 배양에 대한 반복재현성을 보장할 수 없다는 문제점이 있다.

<85> 한편, 제대혈은 최근에 많은 양의 줄기세포를 가지고 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 제대혈이 조혈모세포의 풍부한 원천으로 알려진 이후, 임상적으로 제대혈 이식을 통해 혈액관련 질환을 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 자가이식 치료를 위하여 제대혈을 냉동시켜 수년 후 사용 가능한 상태로 보존하는 제대혈 은행이 국내에서도 활성화되고 있다.

<86> 제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 버려지는 제대(umbilical cord)에서 간단한 기술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있다. 또한, 제대혈 이식시 나타날 수 있는 이식편대숙주반응이 골수 이식에 비해 상당히 적어 제대혈에 포함되어 있는 줄기세포의 성상 확인 및 그의 임상예의 응용 확대를 위한 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다.

<87> 그러나, 제대혈에 중간엽(간엽) 줄기세포의 존재(Erices A, et al., *Br. J. Haematol.* 109: 235-242, 2000; Lee OK, et al., *Blood* 103: 1669-1675, 2004)가 보고되기는 하였으나, 제대혈로부터 중간엽(간엽) 줄기세포를 분리하여 배양하는 것에 대해서는 그 결과가 엇갈리고 있으며, 성공적으로 분리 및 배양된 경우에도 그 반복재현성이 10% 정도로 매우 낮은 실정이다. 또한, 제대혈로부터 분리, 배양된 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포에 비해서 그 양이 너무 적고 쉽게 노화되어 치료목적으로 사용하는데 어려움이 있으며(Wexler SA, et al., *Br. J. Haematol.* 121: 368-74, 2003), 국내외적으로 모두 제대혈을 이용한 특정 세포

군의 분리 및 배양, 그리고 이들의 분화능에 대한 검증이 제대로 이루어지지 않고 있다. 뿐만 아니라, 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 지방세포 등 다양한 조직의 세포로 분화유도가 가능한 줄기세포를 제대혈에서 분리 및 배양하는 방법은 현재까지 알려진 바가 거의 없다.

<88> 이에 본 발명자들은 세포요법, 세포대체요법, 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있는 다분화능 전구/줄기세포를 효과적으로 얻을 수 있는 방법을 예의 연구한 결과, 제대혈로부터 분리한 단핵세포로부터 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 내피세포, 간세포, 수지상세포 등으로 분화 가능한 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하는 방법과 이들을 다양한 조직의 세포로 분화시킬 수 있는 분화유도 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<89> 본 발명의 목적은 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 효율적으로 분리하여 배양하는 방법과 상기의 세포를 다양한 조직의 세포로 분화 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

<90> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제대혈 유래 단핵세포를 일련의 고농도 포도당 동물세포 배양용 배지에서 순차적으로 단층 배양하여 다분화능 전구/

줄기세포를 분리, 배양하는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.

<91> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 다양한 조직의 세포로 분화 유도하는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.

<92> 아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 유효 성분으로 포함하는 세포요법용 조성물을 제공한다.

<93> 본 발명에서 "동물세포 배양용 배지"는 무기염류, 아미노산, 비타민류 및/또는 보조인자를 포함하는 포유동물 세포배양용 배지로서 동물세포 배양 기술분야에서 동물세포 배양을 위해 통상적으로 사용되는 배지를 의미하며, 상업적으로 입수 가능한 동물세포 배양용 배지로 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), MEM(Minimum Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium),  $\alpha$ -MEM, RPMI 1640 배지 등이 있다.

<94> 본 발명에서 "고농도 포도당 배지"는 상기 동물세포 배양용 배지에 3,500 내지 5,500 mg/ml D-글루코스(D-glucose)와 50 내지 200 mg/ml 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)이 첨가된 배지를 의미하며, 상업적으로 입수가능한 고농도 포도당 배지로 HG(high glucose)-DMEM, IMDM 배지 등이 있다.

<95> 본 발명에서 "1차 배양배지"는 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하기 위한 초기 단계의 배지로, 제대혈에 포함된 여러 종류의 단핵 세포들 중에서 다분화능 전구/줄기세포만이 다층세포군집(multi-layer cell

colony)을 형성하도록 유도하는 배지이다. 1차 배양배지는 상기 고농도 포도당 배지에 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), L-글루타민 및 과립구-대식세포 콜로니 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)가 첨가된 배지를 의미한다.

<96> 본 발명에서 "2차 배양배지"는 상기 1차 배양배지에서 배양된 다층세포군집을 섬유아세포(fibroblast-like cells) 형태의 단층세포군집(mono-layer cell colony)으로 변형시키는 배지이다. 2차 배양배지는 상기 1차 배양배지의 조성에서 GM-CSF가 결핍된 배지로 고농도 포도당 배지에 FBS 및 L-글루타민만이 첨가된 배지를 의미한다.

<97> 본 발명에서 "3차 배양배지"는 상기 2차 배양배지에서 배양된 단층세포군집을 형성하는 세포들을 균질한 다분화능 전구/줄기세포로 증식시키는 배지이다. 3차 배양배지는 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF 대신에 줄기세포인자(stem cell factor, SCF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 첨가된 배지로, 고농도 포도당 배지에 FBS, L-글루타민, SCF 및 EGF가 첨가된 배지를 의미한다.

<98> 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하는 본 발명의 방법은 제대혈 유래 단핵세포를 통상적인 동물세포 배양용 배지에 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), L-글루타민 및 과립구-대식세포 콜로니 자극인

자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)가 첨가된 1차 배양배지; 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 배양배지; 및 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF 대신에 줄기세포인자(stem cell factor, SCF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 첨가된 3차 배양배지에 순차적으로 배양하는 단계를 포함한다.

<99> 제대혈은 인간을 포함한 포유동물에서 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취한 혈액으로서 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취하며, 본 발명에서는 인간으로부터 분리된 제대혈을 사용하는 것이 바람직하다.

<100> 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀도구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method)과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

<101> 구체적으로, 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취한 제대혈을 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액(Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 원심분리하여 적혈구층, 단핵세포층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫(pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵세포층만을 새로운 튜브로 옮기고, PBS 등으로 세척하여 단핵세포층 채취시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다.

<102> 이와 같이 분리된 단핵세포는 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 바

로 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관 후 사용할 수 있다.

<103>           상기와 같이 분리된 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리하여 배양하기 위해, 단핵세포를 1차, 2차 및 3차 배양배지에서 순차적으로 배양한다. 본 발명에서, 배양배지는 RPMI1640, MEM,  $\alpha$ -MEM, IMDM, DMEM과 같은 통상적인 동물세포 배양용 배지, 바람직하게는 DMEM을 기본으로 하고 항생제 및/또는 각 배양 목적에 따라 필요한 성분을 첨가하여 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기의 통상적인 동물세포 배양용 배지에 3,500 내지 5,500 mg/ml D-글루코오스(D-glucose)와 50 내지 200 mg/ml 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)을 포함하는 고농도 포도당(high glucose) 배지를 기본으로 하고 항생제 및/또는 각 배양 목적에 따라 필요한 성분을 첨가하여 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 DMEM 배지에 4,500 mg/ml D-글루코오스와 110 mg/ml 피루브산 나트륨이 추가로 포함된 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM(Gibco Cat. No. 12800-017)을 사용하였다. 상기 배지에 첨가될 수 있는 항생제로는 동물세포 배양 기술분야에서 동물세포 배양을 위해 통상적으로 사용되는 항생제이면 어느 것이나 가능하며, 예를 들어 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 카나마이신(kanamycin), 암피실린(ampicillin) 또는 암포테리신 B(amphotericin B) 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 첨가할 수 있다.

<104>           먼저, 1차 배양은 제대혈로부터 바로 분리된 신선한 단핵세포 또는 초저온 냉동보관된 단핵세포를 해동시킨 후, 1차 배양배지에  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^6$  세포/cm<sup>2</sup>의

농도로 접종하여 5 내지 10일 간격으로 신선한 배지로 교체해 주면서 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양한다. 이때, 1차 배양배지로 고농도 포도당 배지에 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF가 첨가된 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 1차 배양은 제대혈에 포함된 여러 종류의 단핵세포들 중에서 다분화능 전구/줄기세포만을 분리하는 단계로, 다분화능 전구/줄기세포가 배양용기의 바닥면에 부착하면서 자라는 다층세포군집을 형성하도록 유도한다. 1차 배양배지에 포함된 GM-CSF는 다분화능 전구/줄기세포가 다층세포군집으로 자라도록 유도하는 역할을 한다.

<105> 1차 배양에 의해 다층세포군집의 형성이 관찰되면 배지를 2차 배양배지로 바꾸어 주는데, 2차 배양배지는 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 배양배지로 고농도 포도당 배지에 10 내지 20% FBS 및 1 내지 2 mM L-글루타민이 첨가된 것이다. 2차 배양은 상기 1차 배양에 연이어 1차 배양된 세포의 배지를 2차 배양배지로 교체하고 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양하는데, 이때 5 내지 10일 간격으로 신선한 배지를 공급해 준다. 2차 배양은 배양용기의 바닥면에 부착되지 않은 세포들을 제거하고, 둥근 형태의 세포(round-shaped cells)로 구성된 다층세포군집이 섬유아세포(fibroblast-like cells) 형태를 보이는 단층세포군집으로 변형되도록 유도하는 단계이다.

<106> 마지막으로 3차 배양은 세포의 미분화상태를 유지하고 이의 증식을 유도하기 위한 것으로서, 2차 배양에 의해 섬유아세포 형태를 보이는 단층세포군집을 형성하는 세포들이 80 내지 90% 유착하여 자라면 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 트립



신(trypsin/EDTA) 용액을 처리하여 세포를 회수한다. 회수된 세포를  $2 \times 10^4$  내지  $8 \times 10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 3차 배양배지에 접종하여 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양하고, 3 내지 5일 간격으로 신선한 배지를 공급하면서 다분화능 전구/줄기세포로의 성장 및 증식을 유도한다. 이때, 3차 배양배지는 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF 대신에 SCF 및 EGF를 포함하는 것으로, 고농도 포도당 배지에 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 10 내지 100 ng/ml SCF 및 5 내지 50 ng/ml EGF가 첨가된 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 이때, SCF와 EGF 모두 줄기세포의 증식을 유도하는 성분으로, 특히 SCF는 줄기세포의 증식과 함께 미분화 상태를 유지하는 역할을 한다.

&lt;107&gt;

상기와 같은 단계에 의해 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 방추형의 세포체를 갖는 섬유아세포-유사 세포(fibroblast-like cell with spindle shaped cell body)의 특징을 나타낸다(도 1 참조). 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석에 의하면, 상기 다분화능 전구/줄기세포는 조혈계통의 항원인 CD14, CD31 및 CD45에 대한 항체에는 양성반응을, 조혈모세포 항원인 CD34 및 CD133에 대한 항체에는 음성반응을, 세포부착 관련 항원인 CD54 및 CD166에 대한 항체에는 양성 및 부분 양성반응을, 중간엽(간엽) 줄기세포의 항원인 CD73(SH3, SH4) 및 CD105(SH2)에 대한 항체에는 음성 및 부분 음성반응을, 인테그린(integrin) 단백질의 항원인 CD49a 및 CD104에 대한 항체에는 음성 및 부분 양성반응을, 이 외의 CD44에 대한 항체에는 양성반응을, CD62E 및 CD90(Thy-1)에 대

한 항체에는 음성반응을 보였다(도 2 참조). 또한, 4주 간격으로 12주간 추적 관찰하였을 때, 12주까지 면역표현형의 변화를 거의 나타내지 않는다(도 3a 및 3b 참조). 즉, 상기 면역표현형 분석 결과로부터, 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 조혈계통 세포이지만 기존에 알려진 조혈줄기세포 혹은 중간엽(간엽) 줄기세포와는 구별되는 다른 세포임을 알 수 있다.

<108> 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 약 5 내지 7일 정도의 배가시간(doubling time)을 보이며, 12주 이상 계속적으로 증식하여 약 30배 이상의 많은 세포를 생성한다(도 4 참조). 또한, 다분화능 전구/줄기세포의 세포주기 분석에서는 약 20% 정도의 세포가 활발히 분열하여 세포증식에 참여하고 있는 것으로 나타난다(도 5 참조). 상기 사실들로부터, 본 발명의 다분화능 전구/줄기세포가 장시간의 배양에도 그 특징을 잃지 않고 계속적으로 증식이 가능하여 균질한 많은 세포를 생성하는 전구/줄기세포의 전형적인 특징을 보임을 알 수 있다.

<109> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 다양한 조직의 세포로 분화시키는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.

<110> 본 발명의 방법에 따르면 다분화능 전구/줄기세포를 특정한 조성의 배지에서 특정한 조건으로 배양하여 다양한 조직의 세포, 예를 들면 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 내피세포, 간세포, 수지상세포 등으로 분화시킬 수 있다.

&lt;111&gt;

먼저, 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포(neuron)로 분화시키기 위한 배지는 상기에서 정의된 고농도 포도당 배지에 FBS, L-글루타민, 레티노산(retinoic acid), 폴스콜린(Folskolin), 신경 성장인자(nerve growth factor; NGF), 보조혼합물 및 베타-머캅토에탄올(beta-mercaptoethanol)이 첨가된 것이 바람직하고, 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다. 상기에서 보조혼합물이란 동물세포 배양 기술분야에서 동물세포 배양을 위해 통상적으로 사용되는 성분으로 10 내지 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  인슐린(insulin), 1 내지 20  $\text{mg}/\text{ml}$  트랜스페린(transferrin), 0.1 내지 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  프로게스테론(progesterone), 1 내지 5  $\text{mg}/\text{ml}$  푸트라신(putrascine) 및/또는 0.1 내지 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  셀레나이트(selenite)의 혼합물을 의미한다. 본 발명에 사용될 수 있는 상업적으로 입수가 가능한 보조혼합물로는 N2 서플리멘트(N2 supplement) 또는 B27 서플리멘트(B27 supplement) 등이 있다.

&lt;112&gt;

본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 0.1 내지 2% FBS, 1 내지 2  $\text{mM}$  L-글루타민, 1 내지 25  $\mu\text{M}$  레티노산, 1 내지 20  $\mu\text{M}$  폴스콜린, 10 내지 100  $\text{ng}/\text{ml}$  NGF, 보조혼합물로  $1\times$  N2 서플리멘트(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  인슐린, 10  $\text{mg}/\text{ml}$  트랜스페린, 0.63  $\mu\text{g}/\text{ml}$  프로게스테론, 1.6  $\text{mg}/\text{ml}$  푸트라신, 0.52  $\mu\text{g}/\text{ml}$  셀레나이트) 및  $1.0\times 10^{-6}$  내지  $1.0\times 10^{-5}\%$  베타-머캅토에탄올이 첨가된 배지를 사용한다. 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를  $2\times 10^4$  내지  $8\times 10^4$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 접종하여 배양용기에 5% 이산화탄소, 37 $^{\circ}\text{C}$  배양기에서 1 내지 2주간

배양한다.

<113>           상기와 같이 배양된 세포는 광학현미경(light microscope) 관찰에서 신경세포 돌기가 잘 뻗어져 있는 전형적인 신경세포의 현미경적 특성을 나타내고(도 6 참조), 형광- 또는 면역세포화학염색법(fluorescence- or immunocytochemistry), 웨스턴 블롯팅(western blotting) 및 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 이용한 검사에서 신경세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 에놀레이즈(neuron specific enolase; NSE), 뉴로필라멘트(neurofilament-L; NFL), 마이크로튜블 관련 단백질-1B(microtubule associated protein-1B; MAP-1B)의 유전자 및 단백질의 발현을 나타낸다(도 7 내지 8 참조). 또한, 기능성 신경세포의 특이적 표지자를 이용하여 분화된 신경세포의 종류를 확인한 결과, 상기와 같이 분화유도된 세포에서 TH(tyrosine hydroxylase) 양성반응을 보이는 도파민성 신경세포, AchE(acetylcholinesterase) 양성반응을 보이는 콜린성 신경세포, GAD(glutamic acid decarboxylase) 양성반응을 보이는 가바성 신경세포 등이 확인된다(도 9 참조). 따라서, 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 기능성 신경세포로 분화 유도되었음을 알 수 있다. 또한, 상기와 같이 배양된 세포를 형광- 또는 면역세포화학염색법으로 검사하면 신경교세포 특이적 단백질인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)와 마이엘린 단백질(myelin basic protein; MBP)의 발현이 검출되므로 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 신경교세포로 분화 유도됨을 확인할 수 있다(도 10 참조).

<114>           또한, 다분화능 전구/줄기세포를 골모세포(osteoblast)로 분화시키기 위한

배지는 고농도 포도당 배지에 FBS, 덱사메타손(dexamethasone), 2-인산 아스코르브산(ascorbate-2-phosphate) 및 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate)가 첨가된 것이 바람직하고, 이에 추가적으로 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다.

<115> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 5 내지 20% FBS, 0.1 내지 1  $\mu$ M 덱사메타손, 10 내지 100  $\mu$ M 2-인산 아스코르브산 및 5 내지 20 mM 베타-글리세로포스페이트가 첨가된 배지를 사용한다. 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를 0.5 내지  $2 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 2 내지 3주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 4일에 한번씩 신선한 배지로 교체해 준다.

<116> 상기와 같이 배양된 세포를 이용한 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase; ALP) 염색 및 RT-PCR에서는 ALP가 강하게 염색됨과 더불어 골모세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 ALP 및 타입 I 프로콜라겐(type I procollagen) 유전자의 발현이 검출되므로, 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 골모세포로 효과적으로 분화 유도됨을 확인할 수 있다(도 11 및 12 참조).

<117> 또한, 다분화능 전구/줄기세포를 근육모세포(myoblast)로 분화시키기 위한 배지는 고농도 포도당 배지에 우혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 및 5-아

자사이티딘(5-azacytidine)이 첨가된 것이 바람직하고, 이에 추가적으로 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다.

<118> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 5 내지 10% BSA 및 10 내지 20  $\mu$ M 5-아자사이티딘을 포함하는 배지를 사용한다. 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $5 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 웰 배양용기에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 5 내지 6주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 4일에 한번씩 신선한 배지로 교체해 준다.

<119> 상기와 같이 배양된 세포는 근육모세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 근육모세포 전사인자와 근육모세포관련 단백질을 대상으로 한 RT-PCR과 형광 면역 세포화학염색법에서 근육모세포 전사인자인 마이오디(MyoD)와 마이오제닌(Myogenin), 그리고 근육모세포의 기능을 담당하는 마이오신 중쇄(myosin heavy chain) 유전자의 발현 및 마이오제닌 단백질의 발현이 검출되므로, 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 근육모세포로 효과적으로 분화 유도됨을 알 수 있다(도 13 및 14 참조).

<120> 다분화능 전구/줄기세포를 내피세포(endothelial progenitor cells; EPCs)로 분화시키기 위한 배지는 고농도 포도당 배지에 FBS 및 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)가 첨가된 것이 바람직하고, 이에 추가적으로 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등

과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다.

<121> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 0.1 내지 2% FBS 및 10 내지 100 ng/ml VEGF가 첨가된 배지를 사용한다. 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $4 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 웰 배양용기에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 2 내지 3주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 4일에 한번씩 신선한 배지로 교체해 준다.

<122> 상기와 같이 배양된 세포는 면역표현형 분석에서 내피세포 관련 항원인 CD14, CD31, CD45, CD105 등에 대한 항체에 양성반응을 나타낸다(도 15 참조). 또한, 내피세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 혈관내피세포 성장인자 수용체-1(Flt-1/VEGFR-1), 혈관내피세포 성장인자 수용체-2(KDR/VEGFR-2), 혈관내피세포 캐드헤린(VE-cadherin), 내피세포 산화질소 합성효소(ecNOS) 및 본 빌브랜드 인자(von Willebrand Factor; vWF) 등의 유전자 발현과 더불어 ecNOS 단백질을 발현한다(도 16 및 17 참조). 또한, 분화유도된 세포를 형광 면역세포화학염색과 ac-LDL 섭취능(uptake) 분석으로 조사하면, 내피세포로 분화유도된 대부분의 세포에서 vWF와 UEA-1 단백질의 발현과 동시에 ac-LDL을 섭취하는 것이 관찰되며, 분화된 내피세포의 실질적 기능 수행 여부를 판단할 수 있는 튜브 형성(tube forming)과 VEGF와 같은 사이토카인의 분비가 확인된다(도 18 내지 20 참조). 따라서, 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 내피세포로 효과적으로 분화 유도됨을 알 수 있다.

<123> 또한, 다분화능 전구/줄기세포를 간세포(hepatocyte)로 분화시키기 위한 배지는 고농도 포도당 배지에 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor; HGF), 온코스타틴 M(oncostatin M) 및 L-글루타민이 첨가된 것이 바람직하고, 이에 추가적으로 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다.

<124> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 10 내지 100 ng/ml HGF, 5 내지 50 ng/ml 온코스타틴 M 및 1 내지 2 mM L-글루타민이 첨가된 배지를 사용한다. 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를  $0.5 \times 10^5$  내지  $2 \times 10^5$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 매트릭젤(Matrigel)이 코팅된 배양용기에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 2 내지 4주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 1주에 한번씩 신선한 배지로 교체해 준다.

<125> 상기와 같이 배양된 세포는 간세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 간세포 핵인자(hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ), 사이토케라틴-8(cytokeratin-8; CK-8), 알부민(albumin) 등의 유전자 및 사이토케라틴, 알부민과 같은 단백질을 발현하므로, 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 간세포로 효과적으로 분화 유도됨을 알 수 있다(도 21 및 22 참조).

<126> 또한, 다분화능 전구/줄기세포를 수지상세포(dendritic cells)로 분화시키기 위해서는, 고농도 포도당 배지에 FBS, L-글루타민, GM-CSF 및 인터루킨-4(interleukin-4; IL-4)가 첨가된 미성숙분화 유도배지에 다분화능 전구/줄기세포



를 배양한 후 상기 미성숙분화 유도배지에서 GM-CSF 및 IL-4 대신에 종양사멸인자- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 및 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)가 첨가된 성숙분화 유도배지에 배양한다. 이때, 미성숙분화 유도배지 및 성숙분화 유도배지 모두 추가적으로 페니실린, 스트렙토마이신, 카나마이신, 암피실린 또는 암포테리신 B 등과 같은 동물세포 배양용 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 포함할 수 있다.

<127> 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 먼저 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM에 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 10 내지 1,000 ng/ml GM-CSF 및 10 내지 100 ng/ml IL-4가 첨가된 미성숙분화 유도배지를 웰 배양용기의 각 웰에 첨가한다. 상기 미성숙분화 유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^7$  세포/웰의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 3 내지 15일간 배양한다. 이때, 배지는 2 내지 3일에 한번씩 신선한 배지로 교체해 준다. 성숙분화를 유도하기 위해 상기 미성숙분화 유도배지에서 배양된 세포를 HG-DMEM에 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 1 내지 100 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1 내지 100 ng/ml IL-1 $\beta$ , 100 내지 10,000 U/ml IL-6 및 0.1 내지 10  $\mu$ g/ml 프로스타글란딘 E2가 첨가된 성숙분화 유도배지로 옮겨 1 내지 7일간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양한다.

<128> 상기와 같이 배양된 세포는 미성숙 수지상세포와 같이 텍스트란-FITC(dextran-FITC)의 섭취능을 나타내고(도 23 참조), 수지상세포 항원인 CD1a, 동시자극 항원

인 CD40, CD80 및 CD86, 성숙한 수지상세포 항원인 CD83, 부착관련 항원인 CD11c, 구조조직적합성 복합체 2형인 HLA-DR에 대한 항체에 대해서는 양성반응을, T 세포 항원인 CD8에 대한 항체에 대해서는 음성반응을 나타내는 면역표현형을 갖는다(도 24 참조). 아울러, 혼합림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR)에서 상기와 같이 분화유도된 세포들은 T 림프구에 대해서 자극량에 비례하는 증식반응을 유도하는 것으로 나타나 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 수지상세포로 효과적으로 분화 유도됨을 알 수 있다(도 25 참조).

<129>           아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 유효성분으로 포함하는 세포요법용 조성물을 제공한다.

<130>           본 발명에 있어서, 다분화능 전구/줄기세포는 임의의 투여경로에 의해서, 구체적으로는 복강 또는 흉강 투여, 피하 투여, 정맥 또는 동맥 혈관내 투여, 근육내 투여, 주사에 의한 국소 투여 등의 방법에 의해서 투여가능하다.

<131>           본 발명에 있어서, 다분화능 전구/줄기세포는 통상의 방법에 기초하여 주사제, 현탁제, 유화제 등의 형태로 투여할 수 있고, 필요에 따라서 프로인트 완전 보조제 등의 보조제에 현탁되거나, 또는 BCG와 같은 보조제 활성을 갖는 물질과 함께 투여하는 것도 가능하다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타

치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 의한 세포요법용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체나 첨가제를 함유할 수 있는데, 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜), 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘), 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다.

&lt;132&gt;

본 발명에 의한 조성물에 있어서 각 유효성분은, 개개의 상황에 따라서 연속적 또는 간헐적으로 투여할 수 있다. 구체적인 투여량은 투여방법, 연령, 체중, 성별, 감수성, 투여시간, 병용 약제 등과 같은 환자의 제조건에 따라 변화될 수 있으며, 하루에 유효성분으로서  $5 \times 10^5$  내지  $2 \times 10^7$  세포/kg 체중, 바람직하게는  $1 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^7$  세포/kg 체중을 1회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 다분화능 전구/줄기세포는 주사제로 하는 것이 바람직하고, 미리 소정 농도로 조절된 것을 그대로 투여하거나 투여 직전에 주사용 생리식염수 등으로 소정농도로 희석해서 투여할 수 있다.

&lt;133&gt;

본 발명에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 다양한 조직의 세포, 예를 들면 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 내피세

포, 간세포, 수지상세포 등으로 분화될 수 있으므로 뇌졸중, 척수질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 간질, 뇌종양 등의 각종 난치성 중추신경계 질환의 치료뿐만 아니라 암, 근육질환, 심장근질환, 간질환, 당뇨병, 혈액질환, 골세포 및 연골세포 치료와 손상된 조직의 재생공학적 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<134> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<135> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<136> <실시예 1> 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양

<137> 제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 자궁수축을 이용하여 제대정맥으로부터 60 내지 150 ml을 채취하는데, 제대혈 채취백(175 ml, 항응고제 CPDA-1 23 ml 포함)을 이용하거나 헤파린 5 ml을 포함하는 50 ml 주사기를 이용하여 채취하였다. 제대혈 채취시 이용되는 모든 기구는 무균 처리된 것을 사용하였으며, 제대혈 채취 전에 소독용 알코올 또는 베타딘으로 채취부위를 소독하였다.

<138> 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위하여, 50 ml 코니칼 튜브에 채취 후 24 시간 이내의 제대혈 15 ml을 분주한 후 15 ml의 인산염 완충용액(Dulbecco's PBS; Hyclone, SH300028.03)을 첨가하여 혼합하였다. 상기 코니칼 튜브의 하단에 피콜-하이팩(Ficoll-Hypaque, Sigma, H8887, 밀도; 1.077 g/ml) 15 ml을 천천히 중첩시

킨 후, 2,000 rpm의 속도로 상온에서 30분간 원심분리하여 하단에 적혈구층, 중간에 단핵세포층 및 상단에 혈청층의 순서로 분리하였다. 이 중, 단핵세포층만을 파스퇴르 피펫을 이용하여 새로운 튜브로 옮기고 PBS 20 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 2,000 rpm의 속도로 상온에서 10분간 원심분리하여 세척하였다. 그 후 상층액을 제거하고, 단핵세포 침전물에 다시 40 ml의 PBS를 처리하여 부유시킨 뒤 단핵세포의 생존도 및 세포수를 측정하여 상온에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다.

<139>            상기의 과정을 거쳐 얻은 단핵세포 침전물을 곧바로 기본배지에 부유시켜 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 사용하거나, 초저온 냉동시켜 보관하였다.

<140>            초저온 냉동보관을 위해, 상기의 단핵세포 침전물을 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함하는 자가혈청에 부유시킨 후 1.8 ml 냉동튜브에  $4 \times 10^7$  내지  $6 \times 10^7$  세포 농도로 분주하였다. 상기 튜브를 오염방지 포장한 후 자동조절 냉동기(program-controlled freezer)에서  $-100^{\circ}\text{C}$ 까지 온도를 낮추어 냉동시키고 액체 질소가 들어있는 초저온 냉동보관 탱크에 보존하였다.

<141>            초저온 냉동보관된 단핵세포를 사용하는 경우에는, 단핵세포가 적재된 냉동튜브를  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 급격하게 해동시킨 후 이를 코니칼 튜브에 옮기고 10배 부피의 10% BSA가 포함된 기본배지를 처리하였다. 상기 튜브를 상온에서 2,000 rpm의 속도로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 얻은 세포 침전물을 이후의 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양과정에 사용하였다.

<142>            T25 세포배양 플라스크에 1차 배양배지 6 ml을 넣은 후 상기와 같이 준비된

제대혈 유래 단핵세포를  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^6$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 접종하였다. 이때, 1차 배양배지로는 HG-DMEM 배지(Gibco, Cat. No. 12800-017, 이하 동일)에 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 ng/ml GM-CSF 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신이 첨가된 배지를 사용하였다. 이를 5% 이산화탄소와 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에 넣어 2주간 배양하였다. 그 후 다층세포군집 형성이 확인되면 1차 배양배지를 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 배양배지로 교체하여 2주간 다시 배양하였고, 매일 배양용기의 바닥면에 부착하여 자라는 단층세포군집의 형성 여부를 관찰하였다. 이때, 2차 배양배지는 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 배지로, 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신이 첨가된 HG-DMEM을 사용하였다. 단층세포군집을 형성한 세포들이 80 내지 90% 유착하여 자란 후 세포의 미분화 상태를 유지하고 증식을 유도하기 위해 2차 배양배지를 제거하고, 단층세포군집을 PBS로 세척한 후 0.25% 트립신/EDTA 용액을 처리하였다. 상기 과정을 거쳐 얻은 세포를 새로운 T25 배양 플라스크에  $2 \times 10^4$  내지  $8 \times 10^4$  세포/ $\text{cm}^2$  농도로 접종하고 3차 배양배지로 교체하여 1주간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양하였다. 이때, 3차 배양배지로는 HG-DMEM에 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml EGF 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신이 첨가된 배지를 사용하였다.

&lt;143&gt;

도 1은 상기 방법에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 현미경으로 관찰한 것으로, 방추형 세포체를 갖는 섬유아세포-

유사 세포(fibroblast-like cell with spindle shaped cell body)의 특징을 확인할 수 있다.

<144> <실시예 2> 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 특성 분석

<145>           상기 실시예 1에서 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 면역표현형을 분석하기 위하여, 배양된 세포에 0.05% 트립신 용액을 처리하여 배양용기로부터 분리시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 세포를  $5 \times 10^5$  세포/200  $\mu$ l의 농도로 PBS에 부유시킨 후 각 항체를 10  $\mu$ l씩 첨가하고 15분간 암실에서 반응시켰다. 그 후 유세포분석용 PBS(Becton Dickinson)로 세포를 2회 세척하고 동일한 PBS 500  $\mu$ l를 첨가한 후 유세포분석기(FACScan, Becton Dickinson)로 분석하였다.

<146>           면역표현형 분석을 위하여 PE- 또는 FITC-접합된, CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49a, CD54, CD62E, CD73, CD90, CD104(이상 BD Sciences), CD105(Ancell Co.), CD133(Miltenyi Biotec) 및 CD166(Ancell Co.)에 대한 FACS용 항체를 사용하였다.

<147>           그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 CD14, CD31, CD44, CD45 및 CD54 항원에 대한 항체에는 양성반응을, CD34, CD49a, CD62E, CD73, CD90 및 CD133

항원에 대한 항체에는 음성반응을 나타내었으며, CD104, CD105 및 CD166 항원에 대한 항체에는 일부 양성반응을 나타내는 특징을 보였다. 또한, 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 배양시간에 따른 면역표현형의 변화를 관찰하기 위하여, 4주 간격으로 12주까지 배양된 세포를 상기와 동일한 방법으로 각각의 면역표현형을 조사한 결과, CD105와 같은 항원의 발현이 일부 감소하는 양상을 보이기는 하지만 대체로 일정한 면역표현형을 유지하는 것을 확인하였다(도 3a 및 3b).

&lt;148&gt;

상기 실시예 1에서 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 증식을 및 세포주기를 분석하기 위하여, 배양된 세포에 0.05% 트립신 용액을 처리하여 배양용기로부터 분리시킨 후 PBS로 2회 세척하고, 트립판 블루(trypsin blue exclusion method)를 이용하여 전체 세포 갯수를 확인한 다음, 4℃에서 1시간 동안 70% 에탄올을 처리하여 고정하였다. 이후 사이클테스트 플러스 DNA(CycleTEST PLUS DNA, BD Science) 시약을 처리하여 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  프로피디움 아이오다인(propidium iodine)으로 표지하고 유세포분석기(FACS Vantage, Becton Dickinson)로 DNA 함량을 분석하여 세포주기를 결정하였다.

&lt;149&gt;

그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 12주까지 계속적으로 증식하여 약 25 내지 30배 정도의 비율로 증가하였으며, 이 과정에서 약 20%(S기 +G2/M기) 정도의 세포가 세포분열에 활발히 참여하고 있음을 확인할 수 있었다.



<150> <실시예 3> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 신경세포로의 분화

<151> <3-1> 신경세포로의 분화 유도

<152> 본 발명에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는지를 확인하기 위하여, 먼저 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포를  $4 \times 10^4$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 분화유도배지에 접종한 후 1 내지 2주간 배양하여 신경세포 분화를 유도하였다. 이때, 신경세포 분화유도 배지로 1% FBS, 2 mM L-글루타민, 10  $\mu\text{M}$  레티노산, 10  $\mu\text{M}$  폴스콜린, 100 ng/ml 신경세포 성장인자,  $1 \times \text{N2}$  서플리멘트(Gibco/BRL), 0.00001% 베타-머캅토에탄올 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신이 첨가된 HG-DMEM을 사용하였다.

<153> <3-2> 신경세포로의 분화 확인

<154> 상기 방법에 따라 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 신경세포로 분화되었는지를 현미경으로 관찰한 결과, 이들은 분화유도 시간이 지남에 따라 신경돌기를 형성하는 등의 전형적인 신경세포 형태를 갖추고 있었다(도 6).

<155> 또한, 신경세포로 분화유도된 세포가 신경세포의 전형적인 표지자를 발현하는지를 확인하기 위하여 형광- 또는 면역세포화학염색법 및 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 먼저, 면역세포화학염색법을 실시하기 위하여 세포가 배양된 슬라이드를 4% 파라폼알데하이드(pH 7.4)에 담가 10분 동안 고정하고 PBS로 약 5분간 3회 세

척하였다. 세척 후 약 30 내지 50  $\mu$ l의 블로킹 용액(blocking solution)을 세포염색면에 적가한 후 37℃에서 약 1시간 동안 반응시켜 비특이적(non-specific) 반응을 차단하고 일차항체(primary antibody)를 37℃에서 약 1 내지 2시간 동안 반응시킨 후 PBS로 약 5분간 3회 세척하였다. 세척 후 이차항체(secondary antibody)를 37℃에서 약 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS로 약 5분간 3회 세척하였다. 항체 반응이 종결되면 저농도에서 고농도의 순차적 에탄올 반응을 이용하여 세포내의 탈수반응을 유도한 후 자일렌(xylene)으로 치환하고, 폴리마운트(poly-mount) 용액을 이용하여 표본제작(mounting)한 후 관찰하였다. 형광 면역세포화학염색을 위해서는 항체반응 종결 후 90% 글리세롤을 이용하여 표본제작 후 형광현미경으로 관찰하였다.

&lt;156&gt;

웨스턴 블롯팅을 실시하기 위하여, 배양용기에서 배지를 제거하고 세척한 후 약 300  $\mu$ l의 리파 완충용액(RIPA buffer)을 넣고 스크래퍼(scrapper)를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄된 세포를 모아 원심분리튜브에 넣고 4℃에서 13,000 rpm의 조건으로 약 10분간 원심분리하여 상층액을 따로 분리하였다. 이로부터 분리된 상층액 속의 단백질을 정량하여 웨스턴 블롯팅에 사용하였다. 미니-겔(Mini-gel) 전기영동장치를 이용하여 웰당 약 30 내지 80  $\mu$ g의 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF 막(PVDF membrane, Amersham Biosciences)으로 이동시켜 블롯(blot)을 얻었다. 얻어진 블롯은 5% 우혈청 알부민 단백질(BSA)이 포함된 TBS(Tris-buffered saline) 용액에서 약 1시간 동안 반응시켜 비특이적 반응을 차단하고 TBS로 세척하였다. 세척 후 일차항체(primary antibody)를 4℃에서 약 12시간 동안

반응시키고 3%의 BSA가 포함된 TBS로 약 10분간 3회 세척하였다. 이후 이차항체 (secondary antibody)를 상온에서 약 1시간 동안 반응시킨 후 다시 3%의 BSA가 포함된 TBS로 약 10분간 3번씩 세척한 다음 단백질의 발현을 확인하기 위하여 ECL (Amersham Biosciences) 용액으로 발색 후 암실에서 X-ray 필름에 감광하여 결과를 확인하였다.

<157> 형광- 또는 면역세포화학염색 및 웨스턴 블롯팅을 위하여 일차항체로는 NSE(Santa Cruz Biotechnology), MAP-1B(Santa Cruz Biotechnology), NF-L(Santa Cruz Biotechnology), TH(Santa Cruz Biotechnology), AchE(Chemicon International), GAD(Santa Cruz Biotechnology), GFAP(Santa Cruz Biotechnology) 및 MBP(Chemicon International) 항체를 사용하였으며, 이차항체로는 항-염소 (anti-goat), 항-마우스(anti-mouse) 또는 항-토끼(anti-rabbit) 퍼옥시다제-접합 (peroxidase-conjugated) 이차항체(Santa Cruz Biotechnology)를 이용하였다.

<158> 그 결과, 본 발명의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 세포가 MAP-1B, NF-L, NSE 등의 신경세포 특이적 표지자를 강하게 발현하고 있어 상기의 방법에 따라 신경세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다(도 7 및 8). 또한, 분화된 신경세포의 종류를 확인한 결과, TH 양성반응을 보이는 도파민성 신경세포, AchE 양성반응을 보이는 콜린성 신경세포, GAD 양성반응을 보이는 가바성 신경세포 등으로 분화되었고(도 9), 별아교세포의 표지자인 GFAP와 희소돌기아교세포의 표지자인 마이엘린/올리고덴드로사이트(myelin/oligodendrocyte) 등의 양성반응이 관찰되어(도 10), 본 발명에 따른 신경세포 분화유도 조건에서 다분

화능 전구/줄기세포가 기능성 신경교세포로 분화되었음을 확인하였다.

<159> <실시예 4> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화

<160> <4-1> 골모세포로의 분화 유도

<161> 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에 0.05% 트립신/EDTA를 처리하여 배양용기로부터 분리하여 배지내에 부유시킨 후 6-웰 배양용기에  $4 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 접종하고 1주일 후, HG-DMEM에 10% BSA(Gibco), 0.1  $\mu$ M 텍사메타손, 100  $\mu$ M 2-인산 아스코르브산, 10 mM 베타-글리세로포스페이트 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 골모세포 분화 유도배지를 각 웰에 첨가하여 2주간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새로운 것으로 갈아주었다.

<162> <4-2> 골모세포로의 분화 확인

<163> 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화를 확인하기 위하여 골모세포를 특이적으로 염색하는 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, ALP) 염색시약을 사용하여 관찰하였다. 먼저, 웰로부터 배지를 제거하고 ALP 완충용액으로 세포를 세척한 후 염색시약(1 mg/ml 나프톨 AS-TR 인산과 2 mg/ml 레드 바이올렛(Fast red violet) LB를 10:1의 비율로 혼합한 것)을 각각 1 ml씩 첨가하고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 염색시약을 제거하고 PBS로 3회

세척하였다. 100% 냉각 알코올을 1 ml씩 첨가하고 30분간 냉장 보관하여 세포를 고정시킨 후 알코올을 제거하고 증류수로 2회 세척한 다음 공기 중에서 건조하여 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 제대혈 유래 골모세포에서만 ALP가 염색되어 상기 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 골모세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다(도 11 참조).

<164> 한편, 분자생물학적 분석방법으로 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 실시하였다. 골모세포로의 분화를 유도한 후  $1 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^7$  세포에 트리졸(Trizol, Invitrogen Inc.) 1 ml을 5분간 처리하여 용해시키고 클로로폼 200  $\mu$ l를 처리하여 15,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리하였다. 이로부터 RNA가 포함된 상층액을 분리하여 새 튜브에 옮긴 후 트리졸 1 ml당 이소프로판올 500  $\mu$ l를 첨가하여 RNA 침전을 유도하였다. 75% 냉각 에탄올로 RNA 펠렛을 세척하고 상온에서 건조시킨 후 DEPC가 포함된 3차 증류수에 적정 농도로 RNA를 용해시켜 역전사 반응의 주형으로 사용하였다.

<165> 상기와 같이 준비된 RNA를 65℃에 5분간 두어 2차 구조를 제거하였다. 역전사 반응용액은 6× 역전사 효소 완충용액 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 2  $\mu$ l, 올리고 d(T) 프라이머(500 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, RNA 분해효소 억제제 0.5  $\mu$ l, 주형 RNA 2  $\mu$ g 및 역전사 효소(200 U/ $\mu$ l; Promega) 1  $\mu$ l를 포함하며, DEPC 처리된 멸균 3차 증류수로 전체 반응부피를 30  $\mu$ l로 적정하였다. 역전사 반응은 42℃에서 90분간 반응시킨 후, 94℃에서 5분간 역전사 효소를 불활성화시켜 cDNA를 합성함으로써 이후 PCR에 사용될

주형 DNA를 제조하였다. PCR은 골모세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: 알칼라인 포스파타아제 유전자를 위한 서열번호: 1 및 2의 프라이머 쌍; 및 타입 I 프로콜라겐(type I procollagen) 유전자를 위한 서열번호: 3 및 4의 프라이머 쌍.

<166>           반응튜브에 각 프라이머(10 pmole) 1  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 혼합액 2  $\mu$ l, 10 $\times$  Taq DNA 중합효소 완충용액(염화마그네슘 포함) 2.5  $\mu$ l, 주형 cDNA 2  $\mu$ l 및 Taq DNA 중합효소(5 U/ $\mu$ l, 바이오퀵스트) 0.1  $\mu$ l를 첨가하고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응부피를 25  $\mu$ l로 적정한 후 각 프라이머 쌍에 대한 반응조건에서 PCR을 실시하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 4분의 최초 변성반응; 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 각 프라이머쌍의 어닐링 온도에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 반응을 35회 반복; 72 $^{\circ}$ C에서 7분의 최종 연장반응. 이때, 각각의 유전자에 대한 프라이머의 어닐링 온도는 알칼라인 포스파타아제가 46 $^{\circ}$ C이고, 타입 I 프로콜라겐이 49 $^{\circ}$ C이다.

<167>           그 결과, 골모세포에서 특이적으로 발현되는 알칼라인 포스파타아제 및 타입 I 프로콜라겐 유전자가 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 골모세포에서 검출됨을 확인하였다(도 12).

<168>   <실시예 5> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 근육모세포로의 분화

<169>   <5-1> 근육모세포로의 분화 유도

<170>           실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에 0.05% 트립신-EDTA를 처리

하여 배양용기로부터 분리하여 배지내에 부유시킨 후 6-웰 배양용기에  $5 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 접종하고 1주일 후, HG-DMEM에 10% BSA(Gibco) 10  $\mu$ M 5-아자사이티딘(5-azacytidine) 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 근육모세포 분화 유도배지를 첨가하여 6주간 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새로운 것으로 갈아주었다.

<171> <5-2> 근육모세포로의 분화 확인

<172> 근육모세포로의 분화를 분자생물학적 방법으로 검증하기 위하여 상기 실시예 4와 동일한 방법에 따라 RT-PCR을 수행하였다. PCR은 근육모세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: 마이오디(myoD) 유전자를 위한 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍; 마이오제닌(myogenine) 유전자를 위한 서열번호: 7 및 8의 프라이머 쌍; 및 마이오신 중쇄(myosin heavy chain) 유전자를 위한 서열번호: 9 및 10의 프라이머 쌍. 프라이머의 어닐링 온도가 마이오디와 마이오제닌은 48℃, 마이오신 중쇄는 56℃인 반응조건에서 PCR을 실시하였다.

<173> 그 결과, 도 13에서와 같이 근육모세포에서 특이적으로 발현되는 근육모세포 전사인자인 마이오디 및 마이오제닌 유전자와 근육모세포에서 기능적 역할을 담당하는 마이오신 중쇄 유전자의 발현을 확인할 수 있었다.

<174> 또한, 실시예 3과 동일한 방법으로 마이오디 및 마이오제닌에 대한 형광 면

역세포화학염색법을 실시한 결과, 마이오디와 마이오제닌이 염색되어 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 근육모세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다(도 14).

<175> <실시예 6> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 내피세포 분화

<176> <6-1> 내피세포로의 분화 유도

<177> 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에서 부유세포만을 취하여 HG-DMEM에 1% FBS, 10 ng/ml VEGF 및 100 U/ml 페니실린-100 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 내피세포 분화 유도배지내로 부유시킨 후 6-웰 배양용기에  $4 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 접종하고 2주일간 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새로 갈아주었다.

<178> <6-2> 내피세포로의 분화 확인

<179> 분화된 내피세포의 면역표현형 발현양상을 유세포분석기를 이용하여 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하였다. 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 내피세포로 분화유도된 세포들은 CD31, CD34, CD105, CD14 및 CD45 항원에 대한 항체에는 양성반응을 나타낸 반면, CD133 항원에 대한 항체에는 음성반응을 나타내었다.

<180> 또한, 상기 실시예 4와 동일한 방법에 따라 RT-PCR을 실시하여 분자생물학적으로 내피세포로의 분화 여부를 조사하였다. PCR은 내피세포에서 특이적으로 발현



된다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: Flt-1/VEGFR-1 유전자를 위한 서열번호: 11 및 12의 프라이머 쌍; KDR(Kinase insert domain receptor)/VEGFR-2 유전자를 위한 서열번호: 13 및 14의 프라이머 쌍; ecNOS 유전자를 위한 서열번호: 15 및 16의 프라이머 쌍; VE-캐드헤린 유전자를 위한 서열번호: 17 및 18의 프라이머 쌍; vWF 유전자를 위한 서열번호: 19 및 20의 프라이머 쌍; 및  $\beta$ -액틴 유전자를 위한 서열번호: 21 및 22의 프라이머 쌍. 프라이머의 어닐링 온도가 모두 56°C인 반응조건에서 PCR을 실시하였다.

<181> 그 결과, 내피세포에서 특이적으로 발현되는 Flt-1/VEGFR-1, KDR/VEGFR-2, ecNOS, VE-캐드헤린 및 vWF 유전자가 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 내피세포에서 검출됨을 확인하였다(도 16).

<182> 다분화능 전구/줄기세포의 내피세포로의 분화를 확인하기 위하여 ecNOS의 발현을 실시예 3과 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯팅으로 조사한 결과, 분화된 내피세포에서 ecNOS 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 17).

<183> 또한, 다분화능 전구/줄기세포의 내피세포로의 분화를 확인하기 위하여 vWF와 UEA-1 단백질의 발현을 실시예 3과 동일한 방법에 따라 형광 면역세포화학염색으로 분석하였으며, 더불어 ac-LDL 섭취능(uptake)을 조사하였다. ac-LDL을 50 ng/ml의 농도로 처리하고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 시약을 제거하고 PBS로 3회 세척하였다. 여기에, 4% 포르말린 시약을 넣어서 30분간 고정한 후 형광현미경으로 관찰하여 ac-LDL 섭취능을 확인하였다. 그

결과, ac-LDL이 세포내로 섭취되었고, vWF 및 UEA-1은 강하게 염색되었다(도 18).

<184>            내피세포로 분화된 세포가 내피세포로서 기능하는지를 확인하기 위하여 튜브 형성(tube forming) 여부를 조사하였다. 먼저, 배양용기에 매트릭젤(matrigel)을 200  $\mu$ l/웰씩 넣고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 30분간 굳힌 다음, 분화된 세포를  $2 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 넣고 24시간 후 튜브 형성을 관찰하였다. 그 결과, 50 내지 60% 정도의 세포가 튜브 형성에 관여하는 것을 확인할 수 있었다(도 19).

<185>            또한, 내피세포로 분화된 세포에서 VEGF를 분비하는지를 확인하기 위해 ELISA 키트(Quantikine, R&D systems)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 VEGF 분비를 확인하였다. 그 결과, 분화된 세포로부터 900 pg 이상의 VEGF가 분비되어(도 20) 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 내피세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다.

<186>    <실시예 7> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 간세포로의 분화

<187>    <7-1> 간세포로의 분화 유도

<188>            실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 분화유도배지에 접종한 후 2 내지 4주간 배양하여 간세포 분화를 유도하였다. 이때, 간세포 분화유도를 위해 HG-DMEM에 25 ng/ml 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor; HGF), 20 ng/ml 온코스타틴 M(oncostatin M; OSM), 2 mM L-글루타민 및 100 U/ml 페니실린-100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 배지를 사용하였고, 동물세

포 배양용기는 매트릭스로 코팅하여 사용하였다.

<189> <7-2> 간세포로의 분화 확인

<190> 다분화능 전구/줄기세포의 간세포로의 분화를 분자생물학적 방법으로 검증하기 위하여 상기 실시예 4와 동일한 방법에 따라 RT-PCR을 수행하였다. PCR은 간세포에서 특이적으로 발현된다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: HNF1-알파(HNF1-alpha) 유전자를 위한 서열번호: 23 및 24의 프라이머 쌍; 사이토케라틴-8(cytokeratin-8, CK-8) 유전자를 위한 서열번호: 25 및 26의 프라이머 쌍; 및 알부민(albumine) 유전자를 위한 서열번호: 27 및 28의 프라이머 쌍. 프라이머의 어닐링 온도가 HNF1-알파와 CK-8은 58℃, 알부민은 62℃인 반응조건에서 PCR을 실시하였다.

<191> 도 21은 RT-PCR을 통해 간세포 표지 유전자의 발현을 확인한 것으로, 간세포에서 특이적으로 발현되는 HNF1-알파, CK-8 및 알부민 유전자가 본 발명의 제대혈 유래 줄기세포에서 분화유도된 간세포에서 검출됨을 알 수 있다.

<192> 다분화능 전구/줄기세포의 간세포로의 분화를 확인하기 위하여 CK-8 및 알부민에 대한 면역세포화학염색을 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 시행하였다. 그 결과, 분화유도된 세포에서 CK-8과 알부민이 염색되어 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 간세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다(도 22).

<193> <실시예 8> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 수지상세포 분화

<194> <8-1> 수지상세포로의 분화 유도

<195> 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에 0.05% 트립신/EDTA를 처리하여 배양용기로부터 분리하여 배지내로 부유시킨 후 6-웰 배양용기에  $5 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 접종하였다. HG-DMEM에 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4 및 100 U/ml 페니실린-100 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 수지상세포 미성숙분화 유도배지를 각 웰에 첨가하고 5일간 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배지는 2 내지 3일에 한번씩 새로 갈아주었다. 성숙분화 유도를 위해 미성숙분화가 유도된 세포들을 미성숙분화 유도배지에서 GM-CSF 및 IL-4 대신에 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 1000 U/ml IL-6 및 1  $\mu$ g/ml 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)를 포함하는 성숙분화 유도배지로 옮겨 2일간 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다.

<196> <8-2> 수지상세포로의 분화 확인

<197> 다분화능 전구/줄기세포의 수지상세포로의 분화를 확인하기 위하여 텍스트란-FITC 섭취능을 조사하였다. 먼저, 배양용기에서 부유세포를 모은 후 PBS로 2회 세척하였다. 세포를  $2 \times 10^5$  세포/200  $\mu$ l의 농도로 FBS가 없는 배양배지에 현탁한 후 20 mg/ml 텍스트란-FITC(Sigma)를 10  $\mu$ l씩 첨가하고 대조군은 4℃에서, 실험군

은 37℃에서 2시간 동안 암반응시켰다. 그 후 유세포분석용 PBS(Becton Dickinson)로 세포를 2회 세척하고 동일한 PBS 500  $\mu$ l를 첨가한 후 유세포분석기 (FACScan, Becton Dickinson)로 분석하였다. 그 결과 도 23에 나타난 바와 같이, 실험군의 미성숙 수지상세포가 대부분의 텍스트란-FITC를 섭취함을 확인하였다.

<198> 또한, 분화유도된 세포의 면역표현형 발현양상을 유세포분석기를 이용하여 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하였다. 분석을 위하여 단핵세포 항원인 CD14, 수지상세포 및 랑게르한스 세포 항원인 CD1a, 세포부착 관련 항원인 CD11c, T 세포 관련 항원인 CD8, 동시자극(Costimulatory) 항원인 CD80, CD86 및 CD40, 성숙 수지상세포 관련 항원인 CD83, 주조직적합성 복합체 2형(Class 2 MHC)인 HLA-DR(이상 BD Sciences)을 사용하였다.

<199> 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD86, CD83 및 HLA-DR 항원에 대한 항체에는 양성반응을 나타낸 반면, CD8 항원에 대한 항체에는 음성반응을 나타내었다.

<200> 또한, 성숙 수지상세포의 T 림프구 증식유도 효과를 혼합림프구 반응(Mixed lymphocyte reaction: MLR) 방법에 따라 하기와 같이 조사하였다. 먼저, 혈액 시료로부터 CD3 자석 입자 용액(Miltenyl Biotech, Bergisch Glandbac, Germany)을 사용하여  $CD3^+$  T 림프구를 분리하였다. 성숙 수지상세포와 T 림프구의 비 (stimulator : responder)가 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 및 1:500이 되도록 T 림프구  $5 \times 10^4$  세포/100  $\mu$ l 및 성숙 수지상 세포  $1 \times 10^2$  내지  $1 \times 10^4$  세포/100  $\mu$ l를 각각

96-웰 플레이트에 첨가한 후 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 4일간 배양하였다. 배양 5일째 BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine) 용액(Roche) 10  $\mu$ l를 첨가하고 다시 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 T 림프구의 증식능을 ELISA 판독기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 도 25에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화유도된 성숙 수지상세포는 T 림프구에 대해서 자극량에 비례하여 증식반응을 유도할 수 있음을 확인하였다.

#### 【발명의 효과】

<201>

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 분리 및 배양방법에 따라 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 높은 생존도와 순도를 유지하면서 분리하여 대량으로 배양할 수 있으며, 분화 유도방법에 의해서는 상기와 같이 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포, 골모세포, 근육모세포, 내피세포, 간세포, 수지상세포 등과 같은 다양한 조직의 세포로 분화시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 얻은 다분화능 전구/줄기세포 및 이로부터 분화된 조직의 세포는 생명체인 배아를 대상으로 하여 생명윤리 논란이 분분한 배아줄기세포를 대신하여 세포요법, 세포대체요법, 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있다.

## 【청구의 범위】

### 【청구항 1】

제대혈 유래 단핵세포를 무기염류, 아미노산, 비타민류 및/또는 보조인자를 포함하는 동물세포 배양용 배지에 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), L-글루타민 및 과립구-대식세포 콜로니 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)가 첨가된 1차 배양배지; 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 배양배지; 및 상기 1차 배양배지에서 GM-CSF 대신에 줄기세포인자(stem cell factor, SCF) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 첨가된 3차 배양배지에서 순차적으로 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법.

### 【청구항 2】

제 1항에 있어서,

동물세포 배양용 배지가 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 【청구항 3】

제 1항에 있어서,

1차 배양배지가 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF를 포함하고; 2차 배양배지가 10 내지 20% FBS 및 1 내지 2 mM L-글루타민을 포함하고; 및 3차 배양배지가 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 10

내지 100 ng/ml SCF 및 5 내지 50 ng/ml EGF를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 4】

제 1항에 있어서,

1차 배양이 단핵세포를  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^6$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 1차 배양배지에 접종하여 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 배양함으로써 이루어지고; 2차 배양이 다층세포군집 형성이 확인된 1차 배양 세포의 배지를 2차 배양배지로 바꾸어 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 배양함으로써 이루어지고; 3차 배양이 단층세포군집 형성이 확인된 2차 배양 세포를  $2 \times 10^4$  내지  $8 \times 10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 3차 배양배지에 접종하여 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 배양함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 5】

제 1항의 방법에 의해 제대혈 유래 단핵세포로부터 분리, 배양된 다분화능 전구/줄기세포.

#### 【청구항 6】

제 5항에 있어서,

CD14, CD31, CD44 및 CD45에 대한 항체에는 양성반응을, CD34, CD62E, CD90(Thy-1) 및 CD133에 대한 항체에는 음성반응을, CD54 및 CD166에 대한 항체에는 양성 및 부분 양성반응을, CD73(SH3, SH4) 및 CD105(SH2)에 대한 항체에는 음성 및 부분 음성



반응을, CD49a 및 CD104에 대한 항체에는 음성 및 부분 양성반응을 나타내는 면역 표현형을 갖는 것을 특징으로 하는 다분화능 전구/줄기세포.

#### 【청구항 7】

제대혈 유래 단핵세포로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하기 위한, 하기 배지 조성물들로 구성된 군으로부터 선택되는 배지 조성물:

무기염류, 아미노산, 비타민류 및/또는 보조인자를 포함하는 동물세포 배양용 배지에 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF가 첨가된 배지 조성물;

무기염류, 아미노산, 비타민류 및/또는 보조인자를 포함하는 동물세포 배양용 배지에 10 내지 20% FBS 및 1 내지 2 mM L-글루타민이 첨가된 배지 조성물; 및

무기염류, 아미노산, 비타민류 및/또는 보조인자를 포함하는 동물세포 배양용 배지에 10 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 10 내지 100 ng/ml 줄기세포인자 및 10 내지 50 ng/ml 상피세포 성장인자가 첨가된 배지 조성물.

#### 【청구항 8】

제 7항에 있어서,

동물세포 배양용 배지가 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

**【청구항 9】**

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에, FBS, L-글루타민, 레티노산(retinoic acid), 폴스콜린(folskolin), 신경 성장인자(nerve growth factor; NGF), 보조혼합물 및 베타-머캅토에탄올(beta-mercaptoethanol)이 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

**【청구항 10】**

제 9항에 있어서,

상기 배지가 0.1 내지 2% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 1 내지 25  $\mu$ M 레티노산, 1 내지 20  $\mu$ M 폴스콜린, 10 내지 100 ng/ml NGF,  $1 \times$  보조혼합물 및  $1 \times 10^{-6}$  내지  $1 \times 10^{-5}$  % 베타-머캅토에탄올을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 11】**

제 9항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $2 \times 10^4$  내지  $8 \times 10^4$  세포/cm<sup>2</sup> 농도로 배지에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 1 내지 2주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 12】**

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을

포함하는 동물세포 배양용 배지에, 0.1 내지 2% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 1 내지 25  $\mu$ M 레티노산, 1 내지 20  $\mu$ M 폴스콜린, 10 내지 100 ng/ml NGF,  $1 \times 10^{-6}$  내지  $1 \times 10^{-5}$  % 베타-머캅토에탄올이 첨가된, 제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위한 배지 조성물.

#### 【청구항 13】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에, FBS, 덱사메타손(dexamethason), 2-인산 아스코르브산(ascorbate-2-phosphate) 및 베타-글리세로포스페이트( $\beta$ -glycerophosphate)가 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 골모세포로 분화시키는 방법.

#### 【청구항 14】

제 13항에 있어서,

상기 배지가 5 내지 20% FBS, 0.1 내지 1  $\mu$ M 덱사메타손, 10 내지 100  $\mu$ M 2-인산 아스코르브산 및 5 내지 20 mM 베타-글리세로포스페이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 15】

제 13항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $5 \times 10^4$  내지  $2 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 배지에 접종하여 5

% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 2 내지 3주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 16】**

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 5 내지 20% FBS, 0.1 내지 1  $\mu$ M 텍사메타손, 10 내지 100  $\mu$ M 2-인산 아스코르브산 및 5 내지 20 mM 베타-글리세로포스페이트이 첨가된, 제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 골모세포로 분화시키기 위한 배지 조성물.

**【청구항 17】**

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에, FBS 및 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)가 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 내피세포로 분화시키는 방법.

**【청구항 18】**

제 17항에 있어서,

상기 배지가 0.1 내지 2% FBS 및 10 내지 100 ng/ml VEGF를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 19】**

제 17항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $4 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 배지에 접종하여 5 % 이산화탄소, 37℃ 조건에서 2 내지 3주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 20】

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 0.1 내지 2% FBS 및 10 내지 100 ng/ml VEGF가 첨가된, 제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 내피세포로 분화시키기 위한 배지 조성물.

#### 【청구항 21】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에, 우혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 및 5-아자사이티딘(5-azacytidine)이 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 근육모세포로 분화시키는 방법.

#### 【청구항 22】

제 21항에 있어서,

상기 배지가 5 내지 10% BSA 및 10 내지 20  $\mu\text{M}$  5-아자사이티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 23】

제 21항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $5 \times 10^5$  세포/웰의 농도로 배지에 접종하여 5 % 이산화탄소, 37℃ 조건에서 5 내지 6주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 24】

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 5 내지 10% BSA 및 10 내지 20  $\mu$ M 5-아자사이티딘이 첨가된, 제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 근육모세포로 분화시키기 위한 배지 조성물.

#### 【청구항 25】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에, 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor; HGF), 온코스타틴 M(oncostatin M) 및 L-글루타민이 첨가된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 간세포로 분화시키는 방법.

#### 【청구항 26】

제 25항에 있어서,

상기 배지가 10 내지 100 ng/ml HGF, 5 내지 50 ng/ml 온코스타틴 M 및 1 내지 2 mM L-글루타민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 27】

제 25항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $5 \times 10^4$  내지  $5 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 농도로 배지에 접종하여 5 % 이산화탄소, 37℃ 조건에서 2 내지 4주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 28】

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 10 내지 100 ng/ml HGF, 5 내지 50 ng/ml 온코스타틴 M 및 1 내지 2 mM L-글루타민이 첨가된, 제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 간세포로 분화시키기 위한 배지 조성물.

#### 【청구항 29】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를, 3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 FBS, L-글루타민, GM-CSF 및 인터루킨-4(interleukin-4; IL-4)가 첨가된 배지에 접종하여 미성숙분화를 유도한 후 미성숙분화가 유도된 세포를 상기 배지에서 GM-CSF 및 IL-4 대신에 종양사멸인자- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 및 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)를 포함하는 배지에 옮겨 성숙분화를 유도하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 수지상세포로 분화시키는 방법.

#### 【청구항 30】

제 29항에 있어서,

상기에서 미성숙분화 유도를 위한 배지가 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타

민, 10 내지 1000 ng/ml GM-CSF 및 10 내지 100 ng/ml IL-4를 포함하고, 성숙분화 유도를 위한 배지가 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 1 내지 100 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1 내지 100 ng/ml IL-1 $\beta$ , 100 내지 10,000 U/ml IL-6 및 0.1 내지 10  $\mu$ g/ml 프로스타글란딘 E2를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 【청구항 31】

제 29항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^7$  세포/웰의 농도로 미성숙분화 유도를 위한 배지에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 3 내지 15일간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 【청구항 32】

제 5항의 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 수지상세포로 분화시키기 위한, 하기 조성을 갖는 배지 조성물:

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 10 내지 1000 ng/ml GM-CSF 및 10 내지 100 ng/ml IL-4가 첨가된 배지 조성물; 및

3,500 내지 5,500 mg/ml의 D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml의 피루브산 나트륨을 포함하는 동물세포 배양용 배지에 1 내지 20% FBS, 1 내지 2 mM L-글루타민, 1 내지 100 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1 내지 100 ng/ml IL-1 $\beta$ , 100 내지 10,000 U/ml IL-6 및 0.1 내지 10  $\mu$ g/ml 프로스타글란딘 E2를 포함하는 배지 조성물.



**【청구항 33】**

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를 유효성분으로 함유하는 세포요법용 조성물.

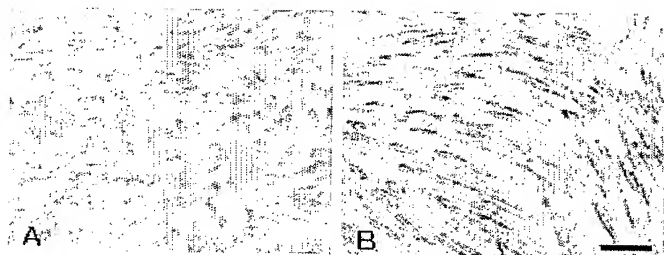
**【청구항 34】**

제 33항에 있어서,

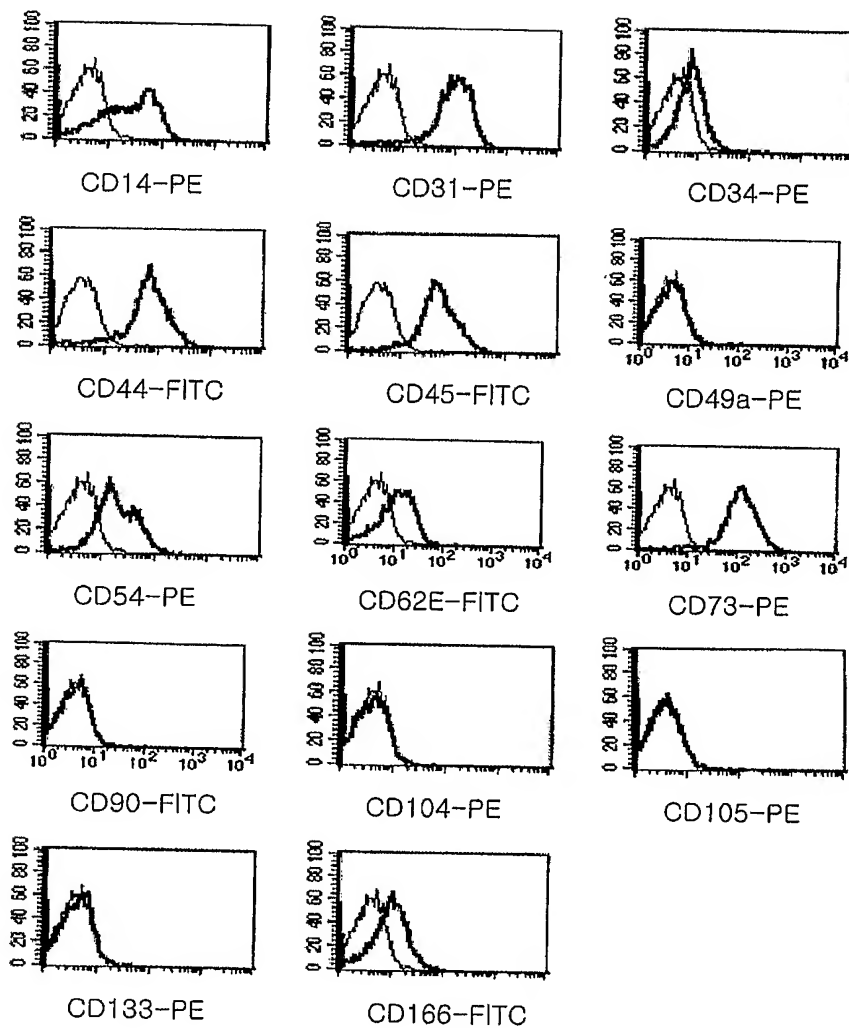
뇌졸중, 척수질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 간질 및 뇌종양의 난치성 중추신경계 질환; 근육질환; 심장근질환; 간질환; 당뇨병; 혈액질환; 골세포 및 연골세포 치료; 또는 손상된 조직의 재생공학적 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

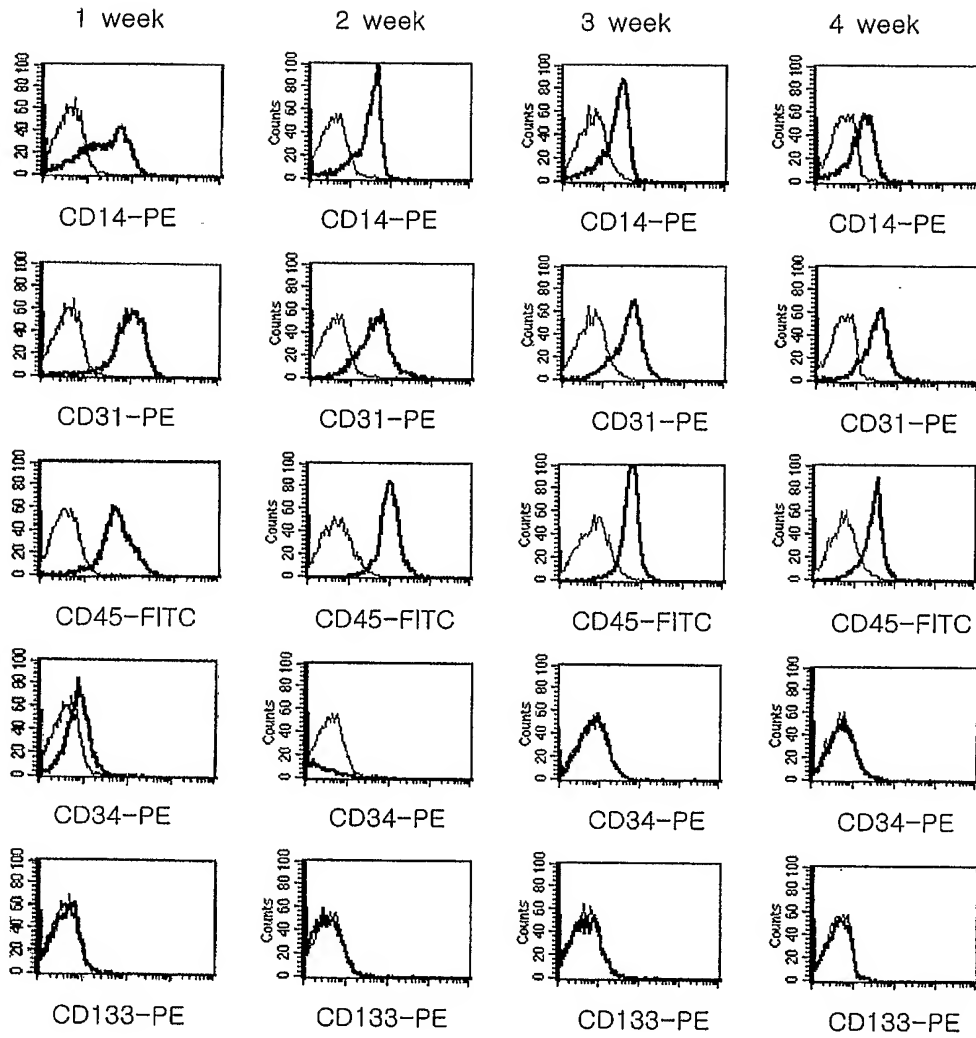
【도 1】



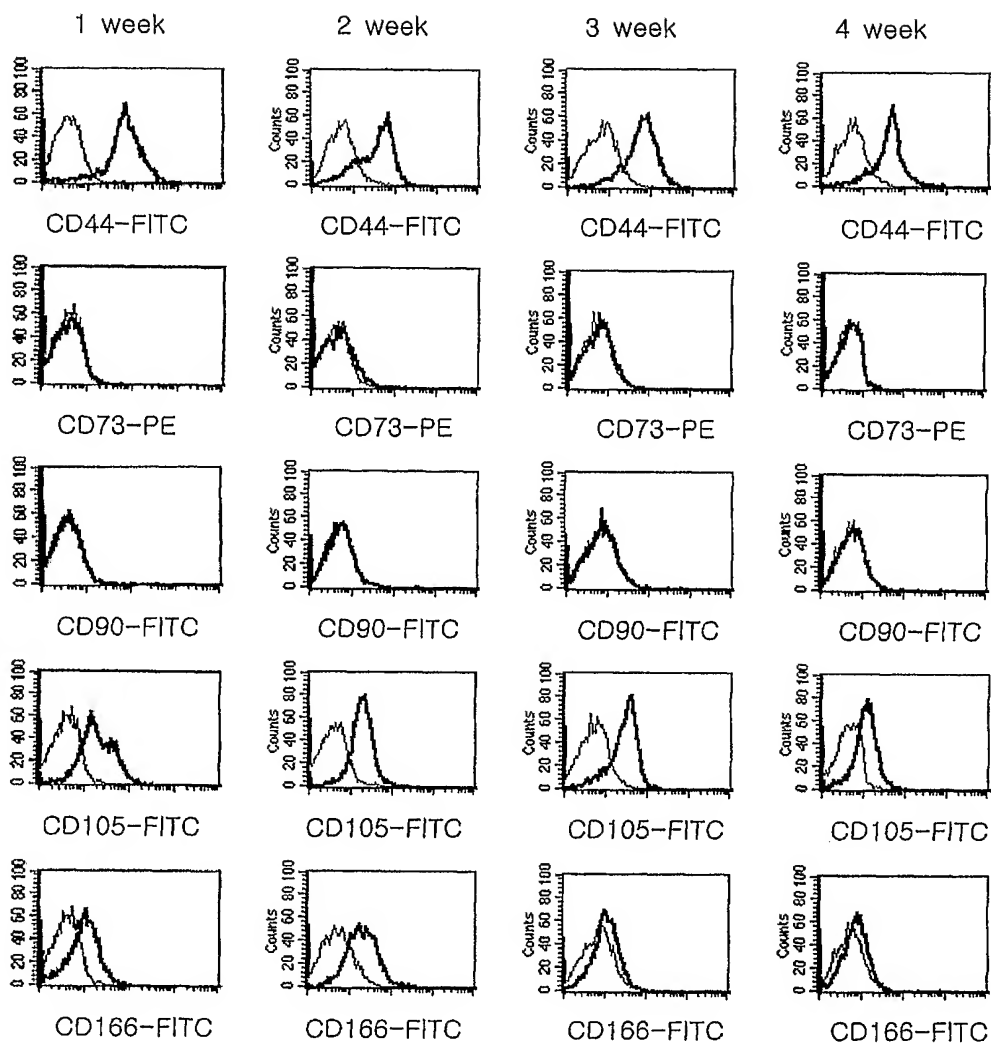
【도 2】



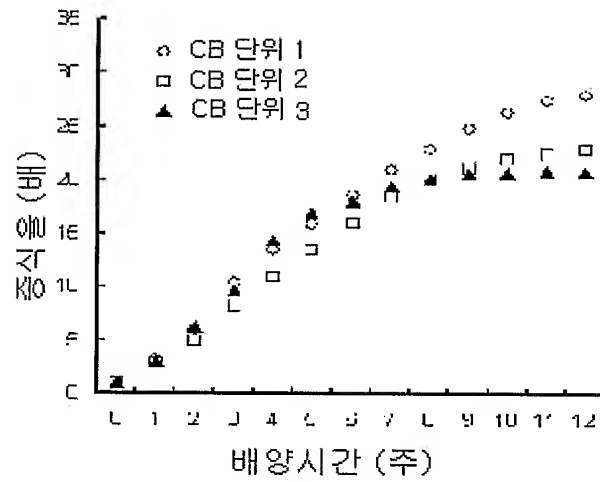
【도 3a】



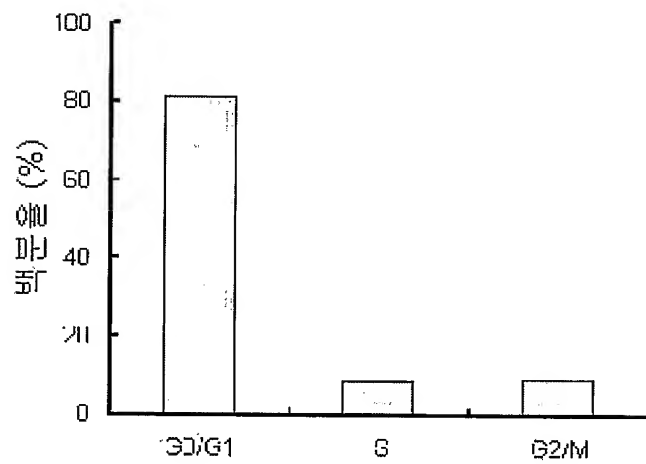
【도 3b】



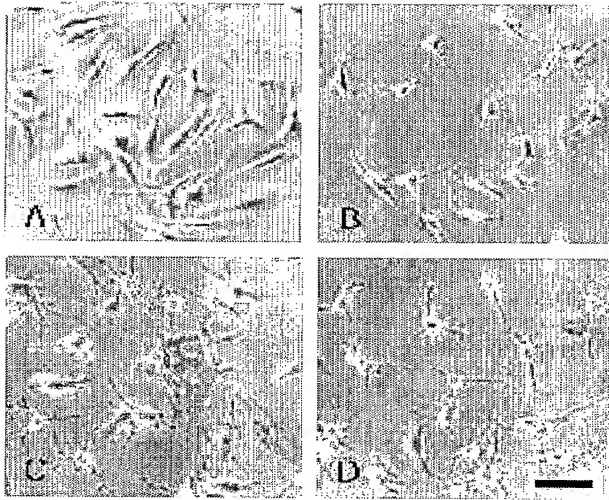
【도 4】



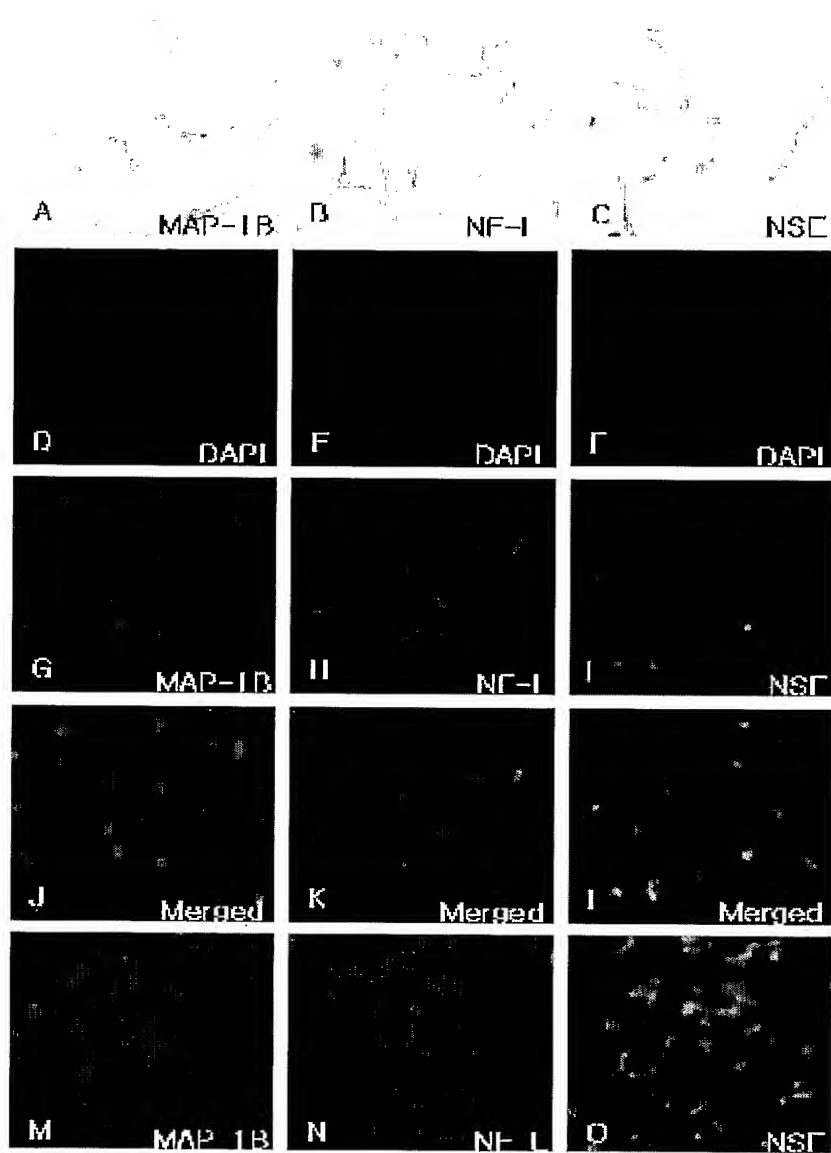
【도 5】



【도 6】

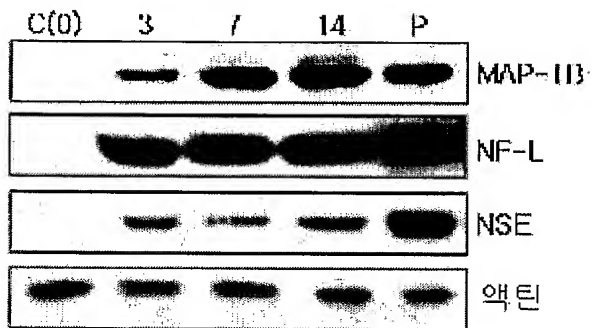


【図 7】

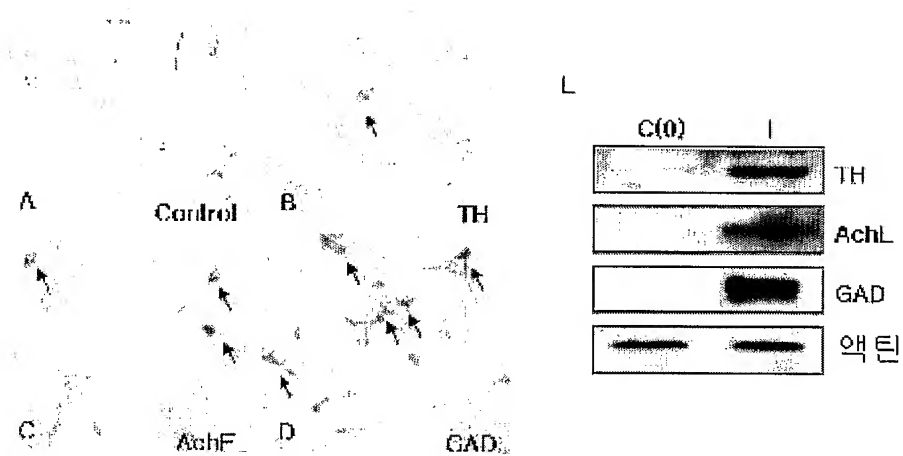




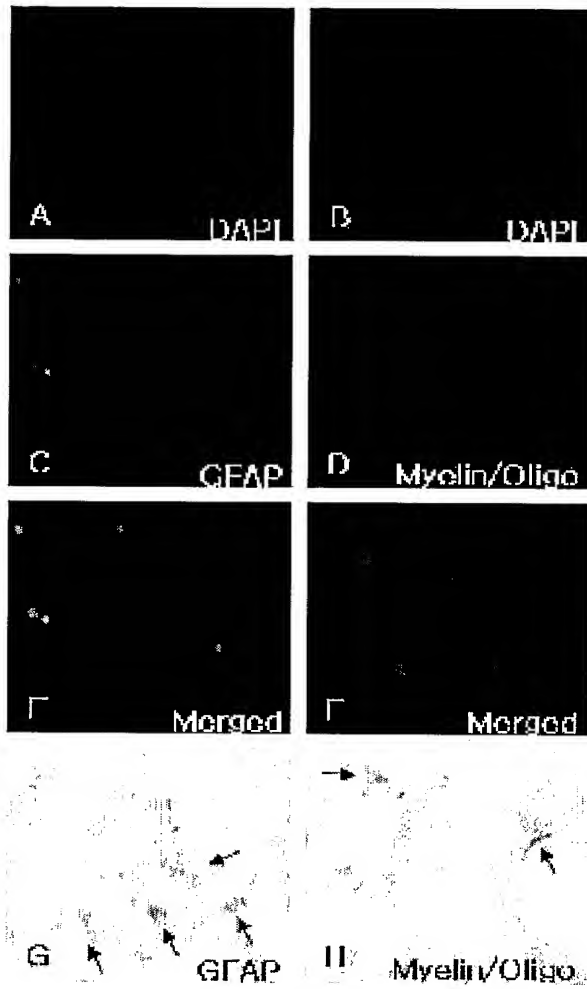
【도 8】



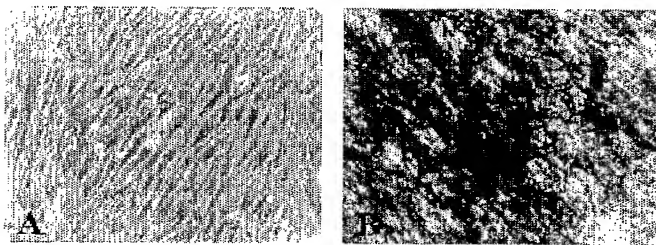
【도 9】



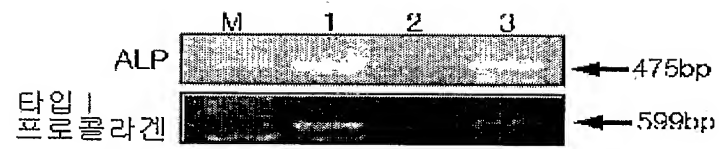
【도 10】



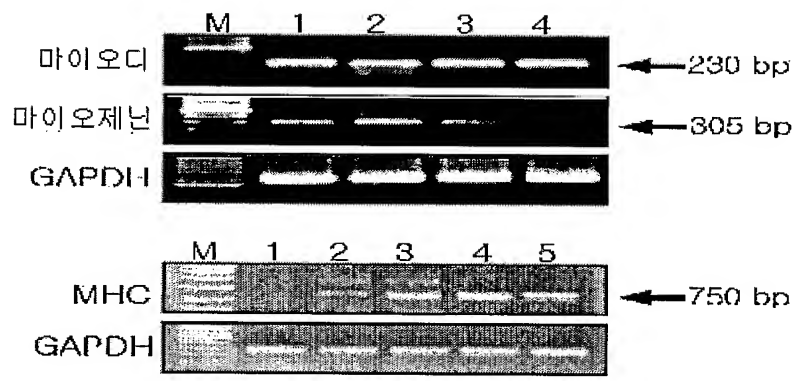
【도 11】



【도 12】



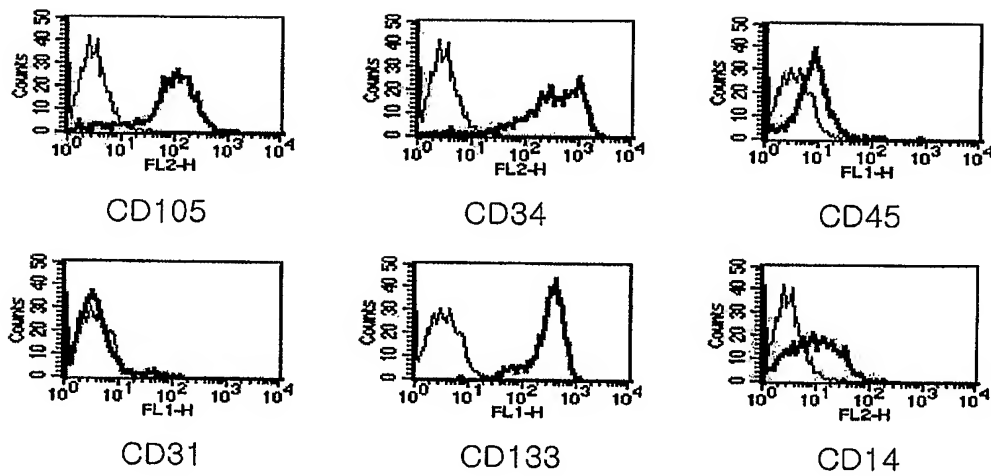
【도 13】



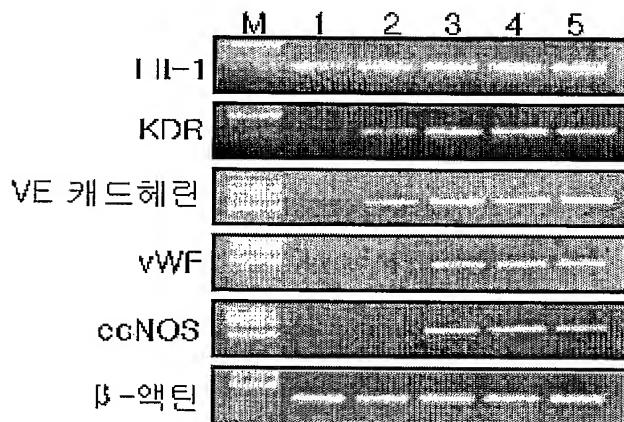
【도 14】



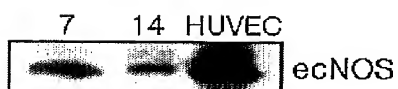
【도 15】



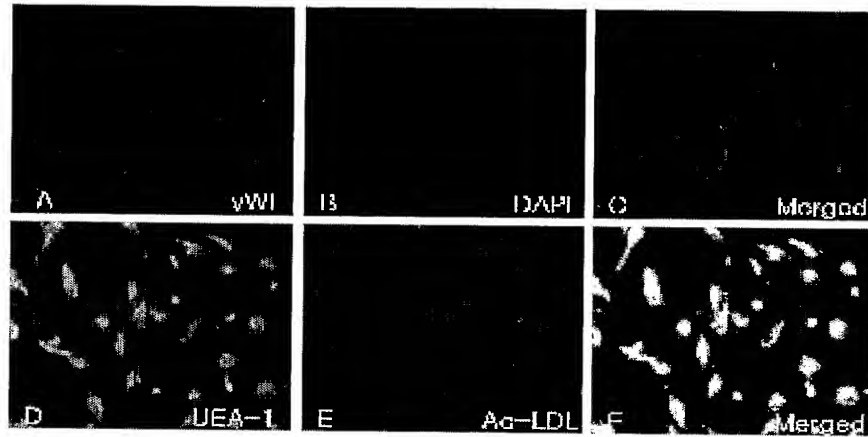
【도 16】



【도 17】



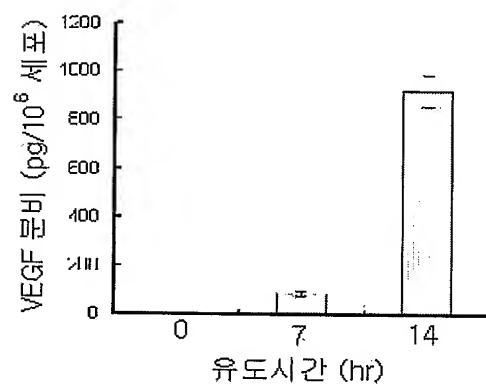
【도 18】



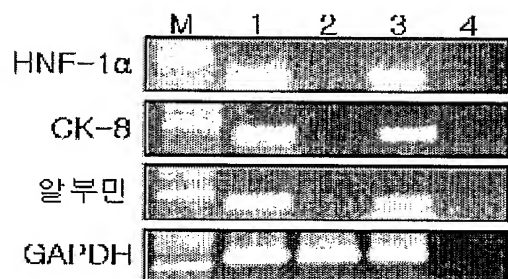
【도 19】



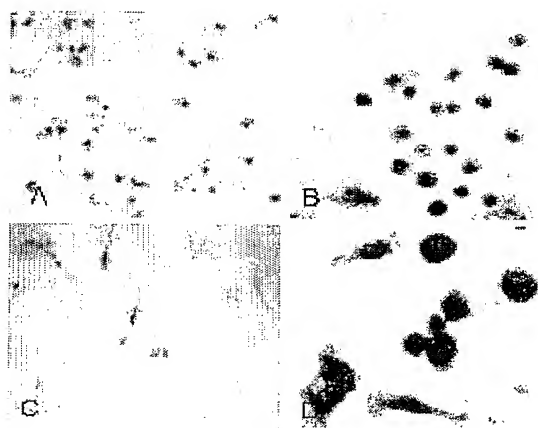
【도 20】



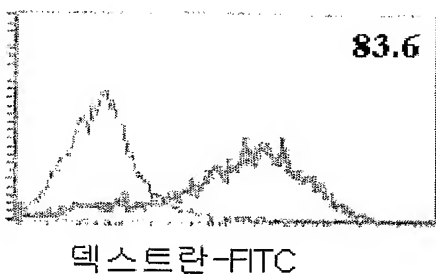
【도 21】



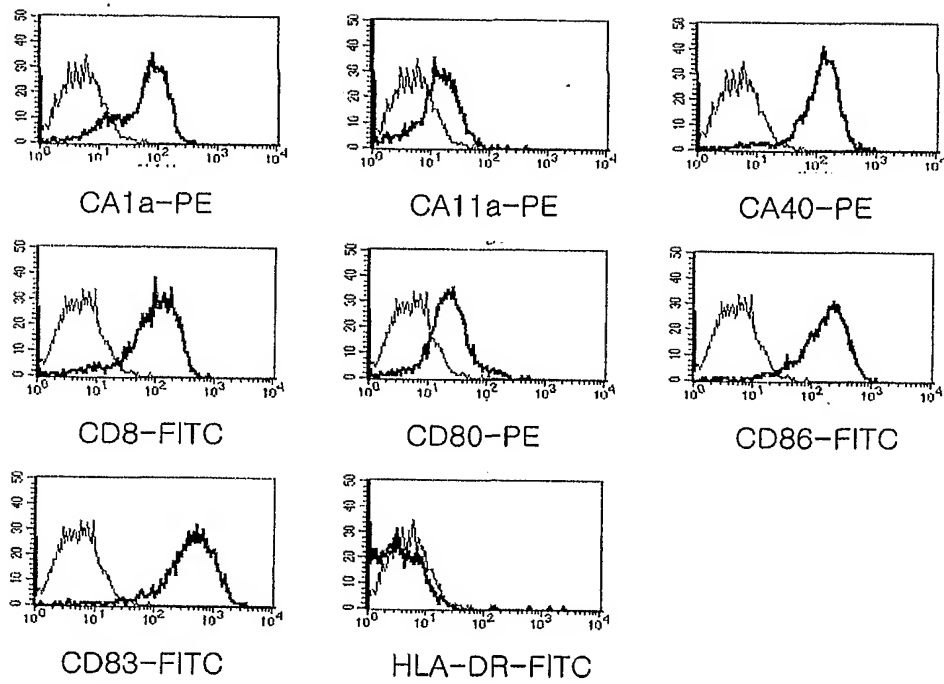
【도 22】



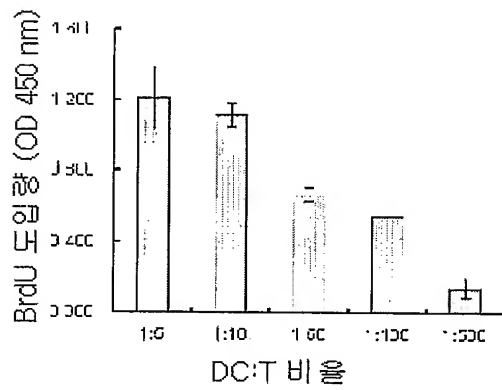
【도 23】



【도 24】



【도 25】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부



